

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
FACULTAD DE CIENCIAS

Nuevas herramientas genéticas para el  
estudio de la vasculatura linfática y de la  
linfangiogénesis *in vivo*

Memoria presentada por Inés Martínez Corral, licenciada  
en Farmacia, para optar al grado de Doctora

Esta tesis doctoral ha sido realizada en la Unidad de  
Ratones Transgénicos del Programa de Biotecnología del  
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO),  
bajo la dirección de la doctora Sagrario Ortega





<b>Abstract</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>5</b>
1.Organización y funciones del sistema linfático	7
2.Desarrollo y crecimiento de la vasculatura linfática	8
3.Marcadores del endotelio linfático	11
4.Señalización por VEGFR3 en la regulación del endotelio linfático	13
4.1 Ligandos de VEGFR3	14
4.2 Patrón de expresión de VEGFR3	14
4.3 Función de VEGFR3 durante el desarrollo y en el adulto	15
5.Papel de la vía de señalización HGF/c-Met en el endotelio linfático	16
6.Linfangiogénesis e inflamación	18
7.Linfangiogénesis tumoral	19
<b>Objetivos</b>	<b>23</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>27</b>
1. Construcción del vector de targeting Flt4-EGFPluc	29
2. Construcción del vector de targeting Flt4-CreERT <sup>2</sup>	30
3. Electroporación en células ES	31
4. Análisis de clones recombinantes homólogos	31
5. Introducción de células ES recombinantes a un embrión en desarrollo	32
6. Análisis y genotipado de ratones	33
7. Análisis de expresión mediante <i>western blot</i>	34
8. Inmunoprecipitación	35
9. Análisis de expresión mediante <i>northern blot</i>	35
10. Monitorización de la expresión de EGFP en embriones	36
11. Determinación de la actividad luciferasa <i>in vivo</i>	36
12. Determinación de la actividad luciferasa <i>in vitro</i>	37
13. Ensayo de cicatrización cutánea	37
14. Inducción de inflamación con el Adyuvante completo de Freund	37
15. Ensayo de hipersensibilidad por contacto	38
16. Detección de precursores endoteliales	38
17. Transfección y establecimiento de las líneas celulares H460mCherry y SW620mCherry	39
18. Ensayos de xenograft	39
19. RT-PCR	40
20. Carcinogénesis química	40

21. Tratamientos con tamoxifeno	41
22. Tinción con X-gal <i>whole mount</i>	41
23. Tinción con X-gal en cortes de congelación	42
24. Inmunofluorescencia	42
25. Inmunohistoquímica	43
<b>Resultados</b>	<b>45</b>
 <b>Parte I: Generación, caracterización y aplicaciones del modelo Flt4-EGFPluc</b>	
<b>1. Generación de la línea Flt4-IRES-EGFPluc</b>	<b>47</b>
1.1. Construcción del vector de targeting	48
1.2. Obtención de clones recombinantes homólogos	50
1.3. Generación de quimeras	51
1.4. Eliminación del casete de selección in vivo	52
<b>2. Caracterización de la línea Flt4-IRES-EGFPluc</b>	<b>52</b>
2.1. Análisis de expresión de FLt4	52
2.2. Detección de EGFP durante el desarrollo embrionario	53
2.3. Análisis de la expresión de VEGFR3 en el desarrollo postnatal por detección de luminiscencia	55
2.4. Expresión de luciferasa/VEGFR3 en diferentes tejidos	58
<b>3. Aplicaciones del modelo Flt4-EGFPluc: Seguimiento y cuantificación de linfangiogénesis en el animal adulto</b>	<b>59</b>
3.1. Linfangiogénesis e inflamación	60
3.1.1 Ensayo de cicatrización de heridas	60
3.1.2 Inflamación inducida por administración intraperitoneal de Adyuvante Completo de Freund	63
3.1.3 Ensayo de hipersensibilidad por contacto. Inducción de inflamación por oxazolona	64
3.1.4 Detección de precursores endoteliales	67
3.2. Linfangiogénesis tumoral	68
3.2.1 Carcinogénesis química	69
3.2.2 Ensayos de xenografts en la línea FLt4-EGFPluc	70
3.2.3 Ensayos de xenografts en la línea Flt4-EGFPlucen fondo genético nu/un	72

## Parte II: Generación, caracterización y aplicaciones del modelo Flt4-CreERT<sup>2</sup>

<b>4. Generación de la línea Flt4-IRES-CreERT<sup>2</sup></b>	<b>79</b>
4.1. Construcción del vector de <i>targeting</i>	80
4.2. Obtención de clones recombinantes homólogos	81
4.3. Generación de quimeras	82
4.4. Eliminación del casete de selección in vivo	83
<b>5. Caracterización de la línea Flt4-IRES-CreERT<sup>2</sup></b>	<b>84</b>
5.1. Análisis de la expresión de Flt4	84
5.2. Análisis del patrón de expresión y de la activación de la recombinasa en el modelo Flt4-CreERT <sup>2</sup> : Crece con la línea reporter de la actividad de Cre, Rosa26LSLlacZ	85
5.2.1. Inducción de la actividad de Cre durante el desarrollo embrionario	86
5.2.2. Inducción de la actividad de Cre durante el desarrollo perinatal	89
5.2.3. Inducción de la actividad de Cre en el animal adulto	91
<b>6. Aplicaciones del modelo Flt4-CreERT<sup>2</sup>-Rosa26LSLlacZ</b>	<b>93</b>
6.1. Detección de precursores endoteliales	93
6.2. Cruce con un modelo genéticamente modificado: knockout condicional de c-Met	94
6.2.1. Inactivación de c-Met durante el desarrollo embrionario	95
6.2.2. Inactivación de c-Met en el animal adulto	101
6.2.2.1 Estudio de la inactivación de c-Met en condiciones fisiológicas	101
6.2.2.2 Estudio de la inactivación de c-Met en linfangiogénesis durante un proceso inflamatorio	103
<b>Discusión</b>	<b>109</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>121</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>139</b>



## Abreviaturas

3'UTR.....	Región 3' no traducida
ACF.....	Adyuvante completo de Freund
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ARN.....	Ácido ribonucleico
DMBA.....	7,12-dimethylbenz[a]anthracene
c-DNA.....	ADN complementario
DXT.....	Dexametasona
EGFP.....	Proteína verde Fluorescente
ERT.....	Dominio de unión al ligando del receptor de estrógeno
fl.....	Alelo floxeado
IRES .....	Sitio de entrada interno de ribosomas
KI.....	Knockin
Luc.....	Luciferasa
NFR.....	Nuclear Fast Red
OXA.....	Oxazolona
PBS.....	Suero salino
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa
PGK.....	Fosfoglicerato quinasa
ROI.....	Región de interés
SDS.....	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TAM.....	Tamoxifeno
TPA.....	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TK.....	Timidina quinasa
WT .....	wild type o Silvestre
X-Gal.....	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galacto-piranósido



## ABSTRACT





The lymphatic system plays a critical role in many physiological and pathological processes such as tissue drainage, nutrient absorption, inflammation, immune response and metastatic spread. Despite of its relevance, little is known about lymphatic vessels development and function. The recent identification of genes that are specifically expressed in the lymphatic endothelium has made possible the generation of new tools that allow the study of this system. One of these genes is *Flt4* (Fms-like-tyrosine kinase-4) that encodes for the vascular endothelial growth factor receptor 3 (VEGFR3), considered one of the best markers of lymphatic endothelial cells.

We have generated a reporter mouse line in which an EGFP-luciferase fusion protein is expressed under the endogenous transcriptional control of the *Flt4* gene without altering physiological VEGFR3 expression or regulation. EGFP expression in this model allows direct visualization of lymphatic vessels by fluorescence detection. In parallel, luciferase expression allows to trace and quantify in vivo lymphangiogenesis associated to different inflammatory processes as well as to trace the recruitment of VEGFR3-expressing cells to inflammation sites. Moreover, this model can be used to monitor tumour-induced lymphangiogenesis in vivo, both at the periphery of the tumour and at distant lymph nodes, and conceivably to predict/estimate the metastatic potential of tumour cells and grafts through the lymphatic system. As far as we know this is the first reporter mouse model for in vivo imaging of lymphangiogenesis-inflammation and tumour metastasis in the mouse.

In parallel, we have generated a mouse line that expresses the inducible Cre recombinase (CreERT2) under the endogenous transcriptional control of the *Flt4* gene. This line provides an excellent genetic tool for the generation of lymphatic-endothelium specific- and conditional- mouse mutants and to study gene function in the lymphatic vasculature. This line has been extensively characterized by crosses with the Cre-reporter line *Rosa26LSLlacZ* using different protocols of tamoxifen administration and verified that the Cre recombinase activity is restricted to VEGFR3 positive cells. Moreover, we have used this line to verify, by lineage tracing, that embryonic progenitor cells are recruited to sites of tissue injury (inflammation) in the mother, and they get incorporated into newly generated lymphatic vessels at those sites, something that had not been previously demonstrated.

Finally, we have used this genetic tool to study the relevance of hepatocyte growth factor /c-Met signalling in the lymphatic endothelium by inactivating c-Met specifically in lymphatic endothelial cells. The initial results of this study show that c-Met signalling is required for the proper development of the lymphatic system and for lymphatic system homeostasis and lymphangiogenesis in the adult.



# INTRODUCCIÓN



## 1. Organización y funciones del sistema linfático

Aunque el sistema linfático es conocido desde antiguo (ya en el siglo XVII Gasparo Aselli describió la existencia de “venas de **aspecto** lechoso” en el mesenterio de un perro), en la actualidad se sabe relativamente poco acerca del desarrollo, función y regulación de la vasculatura linfática. La evidencia de la participación del sistema linfático en diversas patologías tales como linfedema, cáncer, metástasis o algunas enfermedades de tipo inflamatorio ha incrementado el interés por su estudio. Así pues, en la última década el descubrimiento de varios marcadores moleculares que permiten diferenciar entre vasos linfáticos y vasos sanguíneos, así como modelos tanto in vivo como in vitro que permiten el estudio de diferentes aspectos del sistema linfático, han permitido avanzar en el conocimiento de su desarrollo y su función (revisado en Cueni and Detmar 2008).

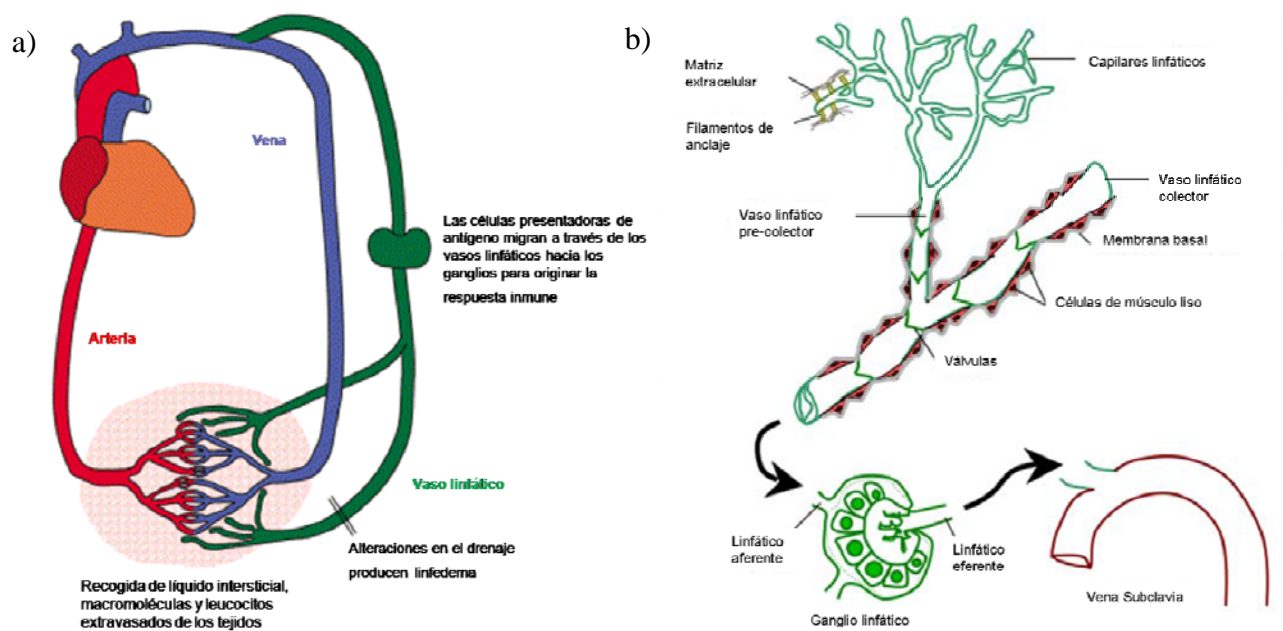
El sistema circulatorio linfático es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del organismo, ya que se encarga de la recogida de macromoléculas y líquido extravasado de los tejidos y de su devolución a la circulación sanguínea. Además juega un papel muy importante en la respuesta inmune mediante el transporte de antígenos y células presentadoras de antígeno hacia los ganglios linfáticos para la formación de linfocitos B o T. Otra de sus funciones es la absorción y el transporte de quilomicrones, que son triglicéridos de cadena larga, o de compuestos lipofílicos que se liberan en el intestino (Jeltsch et al. 2003).

La red vascular linfática se compone de dos tipos de vasos: los capilares, de extremos ciegos y pared fina, y los colectores, de mayor calibre, cuya función es la de drenaje de la linfa de los espacios extracelulares hacia los ductos linfáticos. Los capilares linfáticos se caracterizan porque no poseen válvulas, presentan una membrana basal irregular y, al contrario que los capilares sanguíneos, no están recubiertos de pericitos ni de células musculares lisas, sino que están formados por una única capa de células endoteliales con uniones laxas, que los hacen altamente permeables, permitiéndoles ejercer su función de recogida de líquido intersticial, macromoléculas y leucocitos extravasados de los tejidos. Por otra parte los vasos colectores tienen un recubrimiento irregular de células musculares lisas que favorecen el movimiento de la linfa y presentan válvulas que previenen su retroceso (Revisado en Karpanen and Makinen 2006). Se conectan con el sistema circulatorio a la altura de la vena subclavia, donde vierten su contenido. Ambos tipos de vasos permanecen unidos a los tejidos mediante filamentos de anclaje que evitan el colapso de los vasos en situaciones de presión intersticial elevada (figura 1). Los vasos linfáticos se encuentran presentes en la mayoría de los tejidos y órganos vascularizados salvo en el cerebro, médula ósea y en la retina (Revisado en Karpanen and Alitalo 2008).

Otra de las estructuras que forman parte del sistema linfático son los ganglios linfáticos. El ganglio linfático está formado por una red de fibroblastos reticulares que mantiene una separación entre áreas de linfocitos B y áreas de linfocitos T. Además, esta red de fibroblastos origina una serie de túbulos por los que se produce la entrada de fluido al ganglio, y que sólo permite la entrada de pequeñas moléculas y partículas, incluyendo antígenos. Las moléculas y partículas de mayor tamaño son eliminadas de la linfa mediante la acción de los macrófagos que se encuentran en el área de entrada de los vasos linfáticos

aferentes al ganglio. Esta selección en función del tamaño, previene la entrada de patógenos desde la linfa a la circulación sanguínea (Roozendaal et al. 2008).

Los ganglios linfáticos son esenciales en el inicio de la respuesta inmune. Tanto antígenos como células presentadoras de antígeno son transportadas a los ganglios a través de los vasos linfáticos aferentes, mientras que la mayoría de los linfocitos llegan a través del sistema circulatorio sanguíneo, mediante vénulas especializadas llamadas vénulas de endotelio alto. La estructura del ganglio linfático permite el contacto entre antígenos, células dendríticas y los linfocitos, dando lugar al establecimiento de una respuesta inmune específica (Roozendaal et al. 2008, Revisado en Oliver and Detmar. 2002, Oliver 2004).



**Figura 1:** a) Esquema general de la organización del sistema linfático. b) Estructura y características de la vasculatura linfática y el ganglio linfático. Y sus conexiones con el sistema vascular sanguíneo en la vena subclavia. Figura adaptada de Maby-El Hajjami and Petrova 2008, Alitalo and Carmeliet 2002.

Además de la red vascular linfática y los ganglios forman parte del sistema linfático otros órganos linfoides como son amígdalas, placas de Peyer, bazo y timo. Todos ellos involucrados en la producción de linfocitos y la respuesta inmune (Cueni and Detmar 2008).

## 2. Desarrollo y crecimiento de la vasculatura linfática

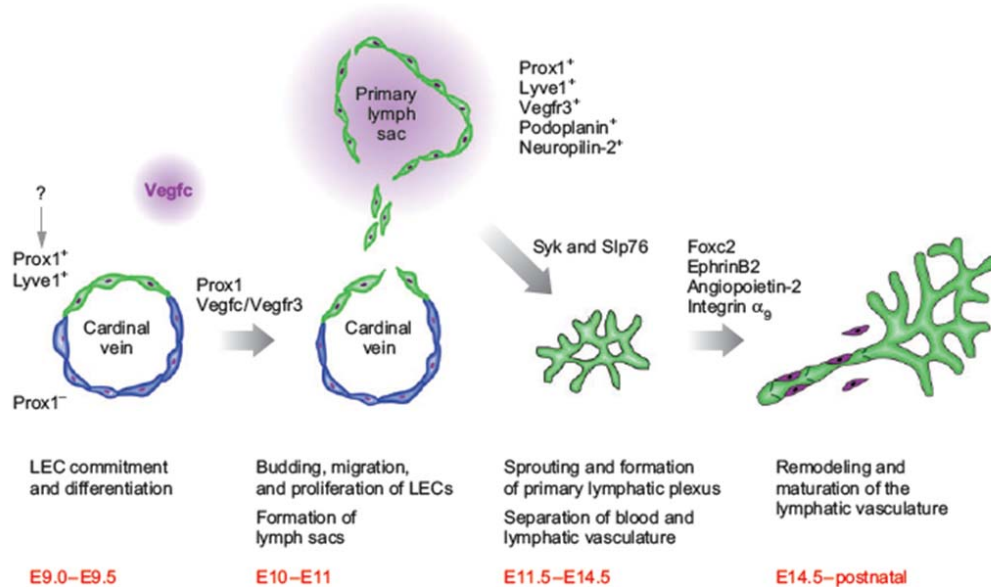
A principios del siglo XX se desarrollaron dos teorías acerca del origen y formación del sistema linfático durante el desarrollo embrionario en mamíferos. La primera de ellas, formulada por Florence Sabin (Sabin 1902, 1904) postulaba que las células endoteliales que migraban de las venas embrionarias durante el desarrollo daban lugar a la formación de los sacos linfáticos primitivos y que el sistema linfático periférico

se formaba posteriormente por gemación a partir de estos sacos linfáticos primarios originados. La segunda teoría, defendida por Huntington y McClure (Huntington and McClure 1910), propone que los sacos linfáticos primarios se originan independientemente de las venas. Sugiere que las células endoteliales linfáticas derivan de células mesenquimales progenitoras a las que denominaron linfangioblastos, que se transforman en células endoteliales linfáticas para contribuir a la formación del sistema linfático durante el desarrollo embrionario, y que su conexión con el sistema circulatorio se produce posteriormente. Durante los últimos 100 años se ha mantenido, y en la actualidad aún se mantiene, cierta controversia con respecto al origen y desarrollo del sistema linfático. Ninguna de estas dos teorías ha sido descartada. Sin embargo, el descubrimiento de genes con expresión específica en el endotelio linfático, está permitiendo en la última década, esclarecer el complejo proceso de formación de este sistema. (Revisado en Karpanen and Alitalo 2008, Cueni and Detmar 2008, Oliver and Srinivasan 2008)

Los últimos estudios apuntan a que tal y como postuló Sabin, la formación de los vasos linfáticos en mamíferos comienza durante el desarrollo embrionario en el momento en el que una subpoblación de células endoteliales que forman parte de la vena cardinal anterior del embrión comienza a expresar receptores linfáticos. Posteriormente estas células migran para originar los sacos linfáticos primarios en la región yugular del embrión. La vasculatura linfática periférica se forma por gemación a partir de éstos sacos linfáticos primarios, seguida de la aparición de una red de capilares y de la remodelación y maduración de los plexos linfáticos primitivos (figura 2). (Revisado en Cueni and Detmar 2008, Karpanen and Alitalo 2008). Durante este proceso, juega un papel relevante el factor de transcripción *Prox1* (*prospero-related protein 1*), que se ha identificado como regulador de la diferenciación a células endoteliales linfáticas durante el desarrollo (Wigle and Oliver 1999). La señal que desencadena este proceso responde a la activación mediada por el factor de transcripción *Sox18* que activa directamente la transcripción de *Prox1* mediante la unión a su promotor (Francois et al. 2008). La inducción de una expresión polarizada de *Prox1* en la vena cardinal del embrión es la que da lugar a la expresión de ciertos genes específicos de endotelio linfático y a la represión de la expresión de genes característicos de la vasculatura sanguínea. La expresión simultánea de genes como *Lyve1*, *Prox1*, *VEGFR3* y *podoplanina* inician un proceso de especificación de las células endoteliales que forman parte de la vena cardinal del embrión a linaje linfático. Recientemente el grupo del Dr. Guillermo Oliver ha establecido que *Prox1* se encarga además del mantenimiento de la identidad de las células endoteliales linfáticas (LECs); la eliminación de *Prox1* en ratón en diferentes momentos del desarrollo es suficiente para originar la desdiferenciación de células endoteliales linfáticas a vasculares (sanguíneas), atribuyendo a *Prox1* una función indispensable en el mantenimiento de la vasculatura linfática (Johnson et al. 2008).

Una vez los sacos linfáticos se han formado, el desarrollo del sistema vascular linfático y el del sanguíneo es independiente, de modo que sólo se mantendrán entre ambos sistemas las conexiones que permiten el retorno de la linfa a la circulación sanguínea (revisado en Hong and Detmar 2004). Entre las moléculas encargadas del control de la separación entre vasos linfáticos y sanguíneos se encuentra la tirosina quinasa *Syk* y la proteína *SLP-76*. La inactivación de cualquiera de estos dos genes en ratones conduce a defectos en las conexiones entre el sistema linfático y sanguíneo durante la embriogénesis (Abtahian et al. 2003). Finalmente la maduración de la red vascular linfática en capilares linfáticos y vasos

colectores requiere la gemación de capilares linfáticos a partir de los ya establecidos, así como la formación de las válvulas de los vasos colectores. En éste último paso juegan un papel importante el factor de transcripción *Foxc2*, la angiopoyetina 2, Neuropilina 2, y Efrina B2 (Revisado en Cueni and Detmar 2008, Karpanen and Alitalo 2008).



**Figura 2.** Esquema de la teoría actualmente más aceptada acerca del desarrollo del sistema linfático durante el desarrollo embrionario en mamíferos. Tomado de Karpanen and Alitalo 2008.

Existen otros datos experimentales que apoyan la teoría de que el sistema linfático tenga un origen venoso como son los experimentos de trazado de linajes realizados en ratón (Srinivasan et al. 2007), o estudios en pez cebra, en los que se observa que las células endoteliales linfáticas se originan a partir de venas primitivas (Yaniv et al. 2006). Sin embargo estudios realizados en aves y en *Xenopus* indican que ciertas porciones del sistema linfático derivan del sistema vascular sanguíneo, y otras se originan a partir de linfangioblastos (Ny et al. 2005, Wilting et al. 2006). No se han reportado evidencias de que en mamíferos los linfangioblastos contribuyan a la linfangiogénesis embrionaria.

En el organismo adulto, la formación de nuevos vasos linfáticos solo se produce en situaciones patológicas tales como procesos de regeneración tisular, inflamación y crecimiento tumoral. Al igual que ocurre durante el desarrollo embrionario, varios procesos pueden contribuir a la formación de nuevos vasos linfáticos en el adulto y la contribución de cada uno de ellos es actualmente materia de controversia. Así, algunos grupos como el del Dr. Kari Alitalo (He et al. 2004, Purhonen et al. 2008) proponen que durante el crecimiento tumoral sólo se produce linfangiogénesis, es decir formación de nuevos vasos linfáticos, a partir de los ya existentes en la zona, sin contribución de células progenitoras endoteliales circulantes. Por otro lado, otros grupos mantienen que células progenitoras circulantes procedente de la médula ósea son capaces de diferenciarse a células endoteliales linfáticas y contribuir a la formación de nuevos vasos, aunque su contribución al proceso de linfangiogénesis, así como la naturaleza de éstas células no se han caracterizado en profundidad (Religa et al. 2005, Kerjaschki et al. 2006).



De hecho, se ha identificado una población de células precursoras endoteliales que expresan tanto marcadores de células progenitoras (CD133 y CD34) como marcadores linfáticos (VEGFR3) en médula ósea (Salven et al. 2003), aunque aún se desconoce su participación en los procesos de generación de nuevos vasos linfáticos. Por otra parte, existe otra población de células, las células progenitoras mesenquimales o MSC (*Mesenchymal stem cells*) que estarían presentes en la periferia de los vasos y a las que también se les ha atribuido un papel importante en la linfangiogénesis. De estas células se conoce su capacidad de diferenciación a fenotipo endotelial, aunque no se sabe demasiado acerca de su contribución a la formación de nuevos vasos sanguíneos o linfáticos. Recientemente se ha reportado que las células mesenquimales progenitoras pueden contribuir a la formación de nuevos vasos linfáticos. (Uccelli et al. 2008; Conrad et al. 2009).

Por otra parte, existen numerosos estudios que muestran el paso de células progenitoras de origen hematopoyético del feto a la madre en condiciones fisiológicas y patológicas tanto en humano como en ratón (Dubernard et al. 2008, Gadi et al. 2007), algunos de ellos, demuestran la contribución de éstas células a la vasculatura sanguínea durante un proceso inflamatorio (Nguyen et al. 2007). También existen estudios de transplantes de órganos en los que se han encontrado células endoteliales del donante en vasos linfáticos o tejido inflamatorio del receptor (Kerjaschki et al. 2006). Igualmente se ha demostrado que los macrófagos son capaces de transdiferenciarse a células endoteliales linfáticas en procesos de inflamación y participar en la generación de nuevos vasos linfáticos (Maruyama et al. 2005, Kerjaschki 2005).

### 3. Marcadores del endotelio linfático

El conocimiento y caracterización de la vasculatura linfática ha avanzado considerablemente en la última década gracias al descubrimiento de marcadores específicos, tanto de endotelio sanguíneo como linfático, que permiten diferenciar entre ambos tipos de endotelio (tabla I). Entre ellos, de los mejor caracterizados es el gen Flt4 (VEGFR3), que por sus características y su patrón de expresión resulta ser un potente marcador de endotelio linfático especialmente en el organismo adulto (Tammela et al. 2005) (Ver apartado 4.2 de esta introducción). Pero además en los últimos años se han identificado otros genes, cuya expresión va también asociada al linaje endotelial linfático como Lyve1, Podoplanina y Prox1, aunque es importante tener en cuenta que todos estos marcadores pueden expresarse en menor grado en otros tipos celulares.

Lyve1 (*Lymphatic vessel hyaluronan receptor-1*), es uno de los factores más utilizados actualmente como marcador de células endoteliales linfáticas (Jackson 2004). Se expresa además en los sinusoides endoteliales de ganglios, hígado y bazo, así como en macrófagos (Gordon et al. 2008). En adultos su expresión está disminuida en vasos linfáticos colectores, pero permanece elevada en capilares linfáticos (Gale et al. 2007). La podoplanina es una glicoproteína transmembranal que se expresa en podocitos, keratinocitos, células del plexo coroideo, células alveolares y células endoteliales linfáticas. Por otra parte el factor de transcripción Prox1 actúa como regulador de la diferenciación a células endoteliales linfáticas durante el desarrollo. Embriones carentes de Prox1 carecen de sacos linfáticos y de vasculatura linfática

(Wiggle and Oliver 1999). Prox1 es uno de los genes encargados del mantenimiento de la identidad de las células endoteliales linfáticas y por tanto se expresa en células endoteliales linfáticas en todos los momentos del desarrollo (Johnson et al. 2008).

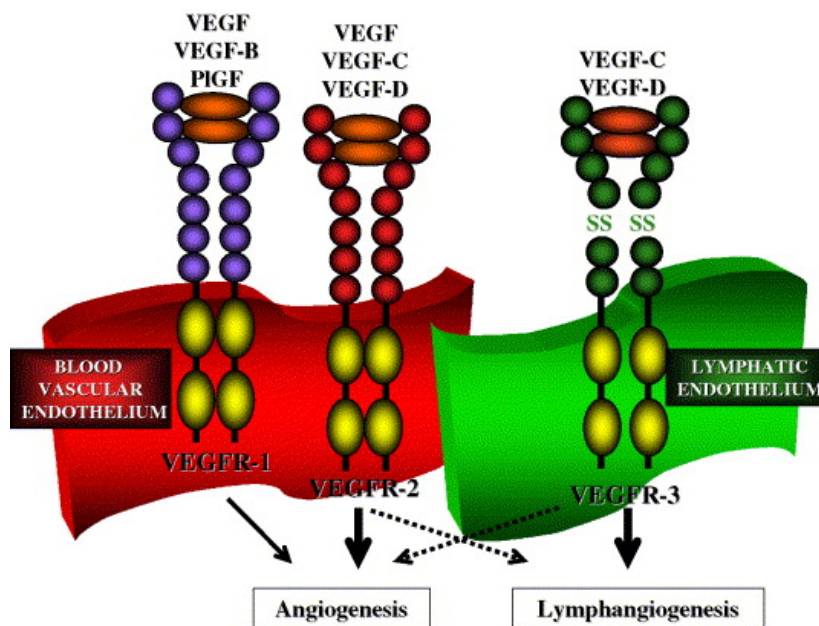
Marcador	Función	LEC	BEC	Referencia
Prox1	Factor de transcripción	++	-	Wigle and Oliver 1999
Podoplanina	Glicoproteína transmembrana	++	-	Schacht et al. 2003
Lyve1	Receptor de hialuronano	++	-	Jackson 2003
<b>VEGFR3</b>	<b>Receptor tirosina quinasa</b>	<b>++</b>	<b>- (+)a</b>	<b>Kaipainen et al. 1995</b>
SLC/CCL21	Quimioquina	+	-	Gunn et al. 1998
Desmoplaquina	Proteína de anclaje de uniones adherentes	+	-	Ebata et al. 2001
Nrp-2	Semaforina y receptor de factor de crecimiento	+	- (+)b	Yuan et al. 2002
Integrina a9	Molécula de adhesión. Coreceptor de VEGFR3	+	-	Huang et al. 2000; Petrova et al.2002
MRC1	Receptor de L-selectina	+	-	Irjala et al.2001
CCL20/MIP-3alfa	Quimioquina	+ (++)c	- (++)c	Hirakawa et al. 2003
VEGFR2	Receptor tirosina quinasa	+	++	Quinn et al. 1993
VE-Cadherina	Molécula de adhesión	+	++	Baluk et al. 2007
CD31	Molécula de adhesión	+	++	Albelda et al. 1991
VEGF-C	Factor de crecimiento	-	+	Hirakawa et al. 2003
VEGFR1	Receptor tirosina quinasa	-	+	Hirakawa et al. 2003
Nrp-1	Semaforina y receptor de factor de crecimiento	-	+	Hong et al. 2002
CD44	Receptor de hialuronano	-	+	Kriehuber et al. 2001
IL-8	Quimioquina CXC	-	+	Petrova et al. 2002
CD34	Molécula de adhesión	- (+)d	++	Young et al. 1995
Endoglin/CD105	Receptor de TGF-B de baja afinidad	-	++	Hirakawa et al. 2003
Meca-32	Desconocida	-	++*	Penn et al. 1993
PAL-E	Anticuerpo que reconoce Nrp1	-	++*	Jaalouk et al. 2007
Colágeno IV	Molécula de membrana basal	- (+)e	++	Hirakawa et al. 2003
Colágeno XVIII	Molécula de membrana basal	- (+)e	++	Hirakawa et al. 2003; Petrova et al. 2002

**Tabla I:** Marcadores de células endoteliales sanguíneas (BECs) y células endoteliales linfáticas (LECs)

(a) Expresión de VEGFR3 descrita en algunos vasos sanguíneos tumorales (b) Nrp2 se encuentra expresada en venas (c) Tanto LECs como BECs expresan CCL20 después de activarse (d) Expresión de CD34 en LECs (e) Los sacos linfáticos primarios carecen de membrana basal o la presentan incompleta.

#### 4. Señalización por VEGFR3 en la regulación del endotelio linfático.

Los factores de crecimiento de endotelio vascular o VEGFs son glicoproteínas diméricas que contienen 8 residuos de cisteína que forman una estructura característica llamada nudo de cisteína. En humanos, la familia de factores de crecimiento vascular incluye 5 miembros: VEGF o VEGF-A, PlGF (factor de crecimiento placentario), VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D. Últimamente a esta familia se han agregado dos factores de origen no humano, el VEGF-E (procedente de virus) y el VEGF-F (procedente del veneno de serpiente) (revisado en Karpanen and Alitalo 2008, Ylä-Herttuala et al. 2007, Jain 2003)



**Figura 3:** Factores de crecimiento vascular endotelial y sus receptores. Figura tomada de Tammela 2005.

Todos estos factores actúan mediante su unión a receptores con actividad tirosina-quinasa de la familia de VEGFR cuya expresión está restringida fundamentalmente al endotelio vascular en condiciones fisiológicas. La transmisión de señales por estos receptores promueve la diferenciación, desarrollo, proliferación, supervivencia y migración celular. Se conocen tres receptores tirosina-quinasa para la familia de VEGF, el VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 (figura 3). Todos ellos se caracterizan por tener 7 dominios homólogos de inmunoglobulinas en la parte extracelular del receptor, una región transmembrana y un dominio intracelular que es el que posee la actividad tirosina-quinasa. La unión del ligando promueve la dimerización del receptor y su autofosforilación. De éstos tres receptores, el VEGFR3 y sus ligandos VEGF-C y VEGF-D están implicados fundamentalmente en la regulación del crecimiento del endotelio linfático (Veikkola et al. 2001). Los otros dos, el VEGFR1 y VEGFR2 se encuentran principalmente en el endotelio sanguíneo. Aunque se ha descrito también la participación de VEGFR2/VEGF-A en los procesos de linfangiogénesis que tienen lugar en los ganglios linfáticos asociados a inflamación (Angeli et al. 2006).

### 4.1 Ligandos de VEGFR3

La vía VEGF-C/VEGF-D/VEGFR3 es una de las principales vías de señalización en los procesos de linfangiogénesis. (Joukov et al. 1996, Achen et al. 1998, Tammela et al. 2005). VEGF-C y VEGF-D se sintetizan como proteínas precursoras que contienen pro-péptidos N y C terminales que flanquean la región de homología característica de los VEGF (Stacker and Achen 1999). Estas proteínas precursoras tienen alta afinidad por el VEGFR-3. Tras un proceso proteolítico, se produce un incremento de la afinidad de éstos factores por VEGFR-2 y por lo tanto en su capacidad para la inducción de procesos de angiogénesis in vivo. (Revisado en Hong et al. 2004) A diferencia de lo que sucede en humanos, donde VEGF-D puede unirse tanto a VEGFR2 como a VEGFR3, en ratón, VEGF-D es un ligando específico para VEGFR-3 (Jeltsch et al. 1997, Baldwin et al. 2001).

VEGF-C se expresa en un gran número de tipos celulares, incluyendo las células mesenquimales próximas a las venas embrionarias, macrófagos activados, músculo esquelético y células de músculo liso de las paredes arteriales. En ratones knockout de VEGF-C se ha observado que durante el desarrollo las células de la vena cardinal del embrión comienzan a expresar Prox1, pero ante la ausencia de VEGF-C no son capaces de migrar para formar los sacos linfáticos primarios indicando de esta manera una función esencial de VEGF-C para el desarrollo del sistema linfático (Karkkainen et al. 2004). A pesar de que en ratones la eliminación de VEGF-C no afecta a procesos de angiogénesis, tanto en *Xenopus* como en pez cebra, VEGF-C es necesario para éstos procesos (Ny et al. 2005; Ober et al. 2004). Por otra parte, la expresión de VEGF-C puede ser inducida en células endoteliales vasculares en respuesta a citoquinas inflamatorias, lo que le confiere un papel importante en los procesos de linfangiogénesis asociados a inflamación y en la respuesta inmune (Ristimaki et al. 1998). De hecho su promotor presenta sitios de unión para NF- $\kappa$ B, lo que sugiere que ésta ruta puede estar involucrada en la inducción de VEGF-C por citoquinas proinflamatorias (Chilov et al. 1997)

Por otro lado VEGF-D se trata de un factor prescindible durante el desarrollo, su eliminación en ratones causa únicamente una disminución en el número de vasos linfáticos alrededor de los bronquiolos, que es el lugar principal de expresión de VEGF-D. Además, la administración de VEGF-D exógeno puede rescatar el fenotipo de los ratones deficientes en VEGF-C (Baldwin et al. 2005) lo que sugiere un alto nivel de redundancia funcional entre ambos receptores.

### 4.2 Patrón de expresión de VEGFR3

La secuencia completa de VEGFR3 fue clonada en 1992 por el grupo del Dr. Kari Alitalo a partir de células humanas de leucemia (HEL) (Pajusola et al. 1992). VEGFR3 también denominado Flt4 (*Fms-like tyrosine kinase 4*), se expresa inicialmente como una proteína de 195kDa que durante un proceso proteolítico da lugar a dos proteínas de menor tamaño, una de 120KDa y otra de 75kDa unidas por un puente disulfuro (Lee 1996). En humanos existen dos isoformas del receptor que difieren únicamente en el

extremo C-Terminal y que se generan por splicing alternativo (Tammela et al. 2005). Sin embargo, en ratones existe un único RNA mensajero y una única isoforma.

El patrón de expresión de éste receptor hace que se considere como uno de los mejores marcadores de endotelio linfático conocidos hasta el momento (Tammela et al. 2005). En ratón su expresión comienza a día E8.5 del desarrollo embrionario y se localiza en el endotelio vascular sanguíneo dónde está implicado en el correcto establecimiento y maduración de los primeros plexos capilares sanguíneos. A lo largo del desarrollo embrionario su expresión disminuye en la vasculatura sanguínea, y a partir de día E13.5 comienza a hacerse específica de la vasculatura linfática. A partir de ese momento y hasta aproximadamente 2 semanas de desarrollo postnatal, existe una expresión elevada del receptor específicamente en el endotelio linfático (Mäkinen et al. 2001, Karpanen and Mäkinen. 2006). En el adulto, en condiciones fisiológicas se mantiene una expresión basal que sólo se ve incrementada en procesos patológicos, siendo ésta más elevada capilares linfáticos (revisado en Oliver 2004). Además de en células endoteliales linfáticas, VEGFR3 se expresa también en vasos sanguíneos fenestrados, y en una subpoblación de monocitos/macrófagos y de células dendríticas. Se ha descrito también expresión del receptor durante el desarrollo embrionario en osteoblastos, en la placa de crecimiento de los huesos largos, y en progenitores neuronales en algunas áreas del bulbo olfatorio y del nervio óptico (Le Bras et al. 2006, Orlandini et al. 2006, Partanen et al. 2000, Schoppmann et al. 2002, Skobe et al. 2001).

La expresión de VEGFR3 en condiciones patológicas ha sido descrita en vasos sanguíneos tumorales y en vasos sanguíneos asociados a procesos de regeneración tisular (Petrova et al. 2008, Laakonen et al. 2007, Partanen et al. 1999, Witmer et al. 2001, Kubo et al. 2000). Sin embargo VEGFR3 no se encuentra expresado en tumores.

### 4.3 Función de VEGFR3 durante el desarrollo y en el adulto

Actualmente se han generado diversos modelos animales que portan mutaciones en los genes de la vía de señalización VEGF-C/VEGF-D/VEGFR3 cuya caracterización ha permitido un avance en el conocimiento de esta vía tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. (Ver Anexo I)

La eliminación de VEGFR3 en ratones origina letalidad embrionaria a día E9.5 por alteraciones en los plexos vasculares primarios y fallo cardiovascular poniendo de manifiesto la importancia de este receptor en el establecimiento de la vasculatura en estadios muy tempranos del desarrollo y anteriores a la formación del sistema linfático (Dumont et al. 1998). Pero la señalización mediante VEGFR3 es esencial no sólo para el mantenimiento de los plexos vasculares primarios, sino también para la formación y el mantenimiento de la vasculatura linfática durante el desarrollo embrionario y durante un periodo postnatal de unas 2 semanas en el ratón. A partir de ese momento VEGFR3 deja de ser esencial en el sistema linfático en condiciones fisiológicas (Mäkinen et al. 2001, Karpanen et al., 2006). La administración a ratones de formas solubles del receptor que son capaces de bloquear la señalización mediada por VEGFR3 y de inhibir la linfangiogénesis y formación de plexos vasculares sanguíneos producen un fenotipo menos pronunciado a medida que aumenta la edad del animal (Mäkinen et al. 2001, Tammela et al. 2008)

VEGFR3 también se encuentra involucrado en procesos de linfangiogénesis asociados a procesos patológicos. Mutaciones en el gen VEGFR3 que originan la inactivación de la actividad tirosina-quinasa están relacionadas con la aparición de linfedema (Enfermedad de Milroy) tanto en humanos como en ratones. El linfedema es una enfermedad crónica y desfigurante que se caracteriza por una hipoplasia de los vasos linfáticos y una alteración en el drenaje de la linfa (Karkkainen et al. 2001, Butler et al. 2006).

Por otra parte, en humanos, en algunos tipos de enfermedades neoplásicas tales como melanoma o cáncer de mama, VEGFR-3 se encuentra sobre-expresado en los vasos linfáticos que se originan en la periferia tumoral y en vasos sanguíneos intratumorales. Esta activación del receptor se corresponde en muchos casos con un incremento en la expresión de sus ligandos en las células tumorales (Achen et al. 2001, Valtola et al. 1999). Por otro lado, en pacientes con cáncer de próstata se ha establecido una correlación entre la activación de VEGFR3 y metástasis en ganglios linfáticos (Jennbacken et al. 2005).

En relación a su participación en procesos de diseminación tumoral y metástasis, se ha comprobado en modelos animales mediante la administración de anticuerpos anti-VEGFR3 o de formas solubles del receptor, que su bloqueo es capaz de inhibir procesos de regeneración en tejidos adultos y metástasis vía sistema linfático en algunos tipos de cáncer, poniendo de manifiesto la importancia de éste receptor en éstos procesos (Pytowski et al 2005, Roberts et al 2006). En relación a sus ligandos, experimentos genéticos en modelos animales que sobreexpresan VEGF-C y VEGF-D indican que estos factores, a través de su interacción con el receptor VEGFR-3 inducen hiperplasia de los vasos linfáticos periféricos al tumor y formación de vasos linfáticos intratumorales, y que estos vasos facilitan la expansión de las células del tumor a los nódulos linfáticos vecinos (Skobe et al. 2001, Stacker et al. 2001, Mandriota et al. 2001). Todos estos estudios ponen de manifiesto la relevancia de la linfangiogénesis en una etapa muy temprana del proceso de formación de metástasis. De hecho, la inhibición de estos factores por medio de la administración de formas solubles del receptor VEGFR3 inhibe la linfangiogénesis así como la formación de metástasis (Revisado en Tammela et al. 2005). VEGF-D, además, se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de neoplasias, tales como cáncer de pulmón o melanoma, contribuyendo a los procesos de angiogénesis y linfangiogénesis. (Achen et al. 2001; Ishii et al. 2004).

## 5. Papel de la vía de señalización HGF/c-Met en el endotelio linfático.

La vía de señalización HGF/c-met está involucrada en procesos de angiogénesis y en procesos de regeneración de varios órganos tales como hígado, riñón y pulmón. Además se ha descrito que juega un papel importante en tumorigénesis, particularmente en las etapas invasivas y metastáticas de la progresión tumoral. (Revisado en Ponzetto et al. 2000)

El factor de crecimiento de hepatocitos o HGF es una glicoproteína producida por varios tipos celulares de origen mesenquimal que actúa mediante la unión a su receptor HGF-R o c-met. El HGF fue identificado originalmente como un mediador de regeneración hepática estimulando la proliferación de los hepatocitos (Nakamura et al. 1989), pero se ha podido comprobar que además es capaz de estimular la proliferación y migración de diversos tipos de células epiteliales y endoteliales (Zarnegar and Michalopoulos 1995). Por



su parte, c-met es un receptor con actividad tirosina quinasa. En condiciones fisiológicas durante el desarrollo embrionario o la regeneración tisular, contribuye a procesos de proliferación celular, migración y protección frente a apoptosis. En condiciones patológicas c-met está implicado en progresión tumoral y formación y diseminación de metástasis. (Revisado en Benvenuti et al. 2007).

Los ratones knockout para HGF y para c-met presentan un fenotipo similar, mueren durante el desarrollo embrionario a E13.5-E16.5 con múltiples anomalías. A pesar de que tanto HGF como c-met se expresan en distintos órganos, los fenotipos más acusados se observan en hígado y placenta, donde ambos genes alcanzan niveles de expresión más altos (revisado en Birchmeier et al. 2003). Para conseguir sobrepasar la letalidad embrionaria del knockout clásico de c-met se ha generado un knockout condicional que permite el estudio de las funciones de ésta vía de señalización en otros momentos del desarrollo del animal (Huh et al. 2004) Utilizando este modelo se ha caracterizado un knockout específico de c-met en hígado que ha puesto de manifiesto que en condiciones fisiológicas c-met no es esencial para la función de los hepatocitos en animales adultos, y sin embargo en condiciones patológicas de daño hepático estos animales presentan un mayor sensibilidad a la apoptosis mediada por Fas (Huh et al. 2004).

Por otra parte, análisis patológicos en humanos han puesto de manifiesto la importancia de éste factor en los procesos de regeneración tisular y de progresión tumoral y metástasis (Rosen et al. 1994, Silvagno et al. 1995, revisado en Jeffers et al. 1996, Matsumoto and Nakamura 2005, 2008). Una expresión elevada de c-met ha sido descrita en carcinomas papilares del tiroides o carcinomas de colon, próstata y ovario. Además también se han descrito mutaciones puntuales activantes del receptor en otros tipos tumorales. Son numerosos los estudios que describen una correlación entre los niveles de expresión de este gen o la presencia de mutaciones en su secuencia con los procesos de diseminación tumoral y metástasis. En algunos tipos de tumores la alteración en la señalización por ésta vía, está asociada a mal pronóstico (Birchmeier et al. 2003, Comoglio et al. 2002, Danilkovitch-Miagkova and Zbar. 2002). Esta correlación ha sido atribuida al papel que HGF/c-met juega en las células tumorales así como en los vasos sanguíneos estimulando la angiogénesis tumoral (Kajiya et al. 2005, Cao et al. 2006).

En relación a su contribución a procesos de angiogénesis se sabe que HGF induce la expresión de VEGF en diferentes tipos celulares (Pennachietti et al. 2003) e igualmente promueve el crecimiento, supervivencia y motilidad de células endoteliales en cultivo (Zhang et al. 2003; Ma et al. 2002). Estos datos sugieren que c-met podría promover la angiogénesis. Si bien esta hipótesis no ha sido suficientemente demostrada in vivo, en ensayos de xenografts con células tumorales que sobreexpresan HGF se ha visto que el crecimiento tumoral se frena tras la administración del antagonista de HGF, NK4, o de una forma soluble de c-met, produciéndose un bloqueo de la angiogénesis tumoral (Purdie et al. 2002).

Estudios más recientes muestran que c-met también se encuentra presente en el endotelio linfático. In vitro, las células endoteliales linfáticas (LECs) presentan niveles de c-met significativamente superiores a las sanguíneas, lo que sugiere que la vía de señalización HGF/c-met podría tener una función específica en este tipo celular (Kajiya et al. 2005). En condiciones fisiológicas, los vasos linfáticos no expresan este receptor o lo hacen a niveles bajos, sin embargo se ha demostrado que durante procesos de regeneración tisular o procesos inflamatorios sus niveles de expresión se encuentran incrementados fuertemente (Kajiya et al. 2005). La participación de este receptor en procesos de linfangiogénesis y metástasis linfática se

trata de un debate abierto. Existen algunas publicaciones que relacionan la ruta de señalización de HGF/c-met con la generación de nuevos vasos linfáticos, sin embargo no se conoce de forma detallada cómo tiene lugar este proceso (Jian et al. 2000, Kajiya et al. 2005, Cao et al. 2006). En diversos tipos de tumores murinos un aumento de HGF da lugar no solo a un incremento en el crecimiento tumoral y metástasis, sino que también origina a un aumento en el número de vasos linfáticos que se forman tanto en el área peritumoral como en el propio tumor, indicando de éste modo una relación entre el factor de crecimiento de hepatocitos y los procesos de linfangiogénesis (Jiang et al. 2005). En otros estudios se establece una relación entre c-met y VEGFR3. Por ejemplo, la implantación de HGF en córnea da lugar a la formación de vasos linfáticos *de novo*. Este proceso de linfangiogénesis puede ser parcialmente inhibida por la administración de la forma soluble de VEGFR3 (Cao et al. 2006).

Estas evidencias apuntan a que la ruta de señalización HGF/c-met puede tener un papel relevante en la regulación del endotelio linfático, aunque los posibles mecanismos de actuación de ésta vía de señalización así como su función *in vivo* en condiciones fisiológicas y patológicas aún se desconocen.

## 6. Linfangiogénesis e inflamación

Existe una estrecha relación entre los procesos de generación de nuevos vasos linfáticos y los procesos patológicos que cursan con inflamación. Por una parte los vasos linfáticos regulan las respuestas inflamatorias mediando el transporte de células presentadoras de antígeno desde el sitio de la inflamación a órganos linfoides secundarios para originar una respuesta inmune (revisado en Halin and Detmar 2006, Karpanen and Alitalo 2008, Cueni and Detmar 2008). Por otro lado, al lugar en el que se produce la inflamación se reclutan células inflamatorias (macrófagos, entre otras) que producen señales angiogénicas y linfangiogénicas. Algunas de estas células (subpoblaciones de monocitos y macrófagos) expresan VEGFR3. (Ristimäki et al. 1998, Watari et al. 2008). Los macrófagos contribuyen al proceso de inflamación y linfangiogénesis de varias maneras. Por un lado secretan, VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D, que promueven la generación de nuevos vasos linfáticos y sanguíneos (Cursiefen et al. 2004, Kataru et al. 2009). Por otro lado, los macrófagos pueden transdiferenciarse a células endoteliales linfáticas y contribuir a la formación de nuevos vasos linfáticos en el lugar de la inflamación (Kerjaschki 2005, Maruyama et al. 2005). *In vitro* se ha podido comprobar que macrófagos positivos para CD11b pueden dar lugar a estructuras tubulares que expresan marcadores de endotelio linfático (Maruyama 2005). Además, la eliminación de macrófagos mediante un tratamiento con liposomas de clodronato en ratones, elimina completamente la linfangiogénesis en la córnea del animal durante un proceso inflamatorio (Maruyama 2005), lo que apoya la relevancia de este tipo celular en los procesos de linfangiogénesis.

Numerosos estudios recientes relacionan la inflamación con procesos de linfangiogénesis en modelos animales de psoriasis, artritis reumatoide o inflamación crónica de las vías respiratorias (Baluk et al. 2005, Zhang et al. 2007, Paavonen et al. 2002). La proliferación de vasos linfáticos también ha sido descrita en casos de rechazo de trasplante de riñón y en modelos de neovascularización por inflamación en la córnea (Chen et al. 2004, Kerjaschki et al. 2006, revisado en Jurisic and Detmar 2009). Por otro lado, se ha



descrito en ensayos de cicatrización que la generación de nuevos vasos linfáticos que expresan VEGFR3 es importante para la correcta cicatrización del tejido (Paavonen et al. 2000, Ji et al. 2004).

Pese a todos éstos datos, el papel que desempeña la linfangiogénesis en la inflamación aún no está completamente caracterizado y entendido. Por un lado puede resultar un proceso beneficioso en los casos de inflamación crónica, pues los vasos linfáticos drenan el exceso de fluido y citoquinas inflamatorias del lugar de la inflamación. De hecho, la inhibición de VEGFR3 promueve la aparición de edema en modelos animales de inflamación crónica de vías respiratorias (Baluk 2005). Además, estudios en humanos ponen de manifiesto que una alteración en el drenaje linfático produce un empeoramiento de la situación en caso de daño tisular (Kajiya 2007). Por otro lado, la activación de los vasos linfáticos y generación de vasos nuevos ayudan al establecimiento de la respuesta inflamatoria que supone una situación perjudicial en el caso de trasplante de órganos. Así, los procesos de linfangiogénesis contribuyen al rechazo en el trasplante de riñón debido a que promueven la movilización de células dendríticas activadas. (Kerjaschki 2004). Consistente con esta idea es el hecho de que un bloqueo de VEGFR-3 en las fases iniciales del proceso inflamatorio, dificulta el transporte de células dendríticas a los ganglios linfáticos evitando así el rechazo en el trasplante de córnea (Chen 2004).

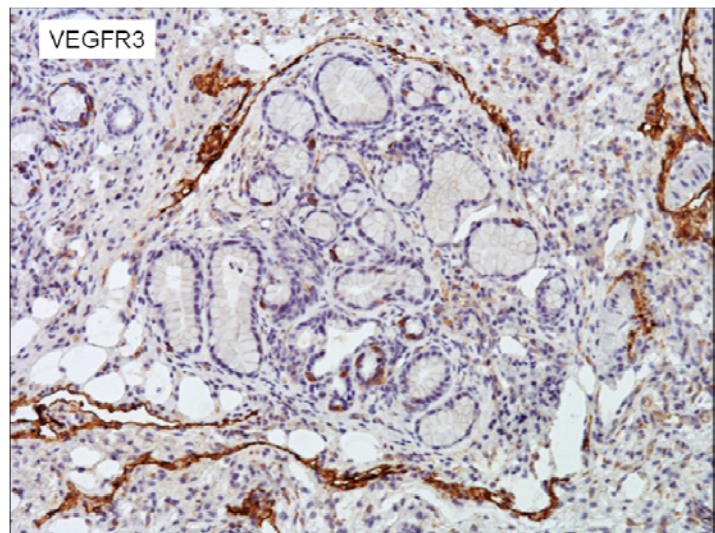
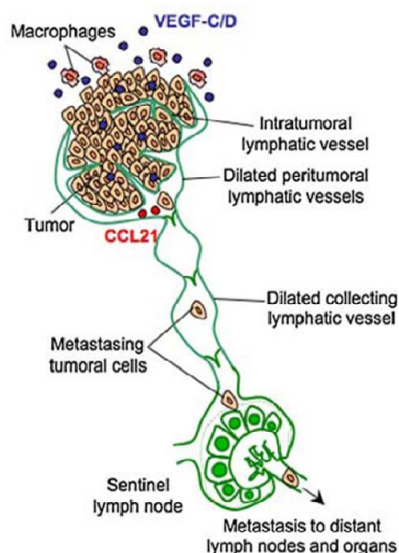
## 7. Linfangiogénesis tumoral

La mortalidad en casos de cáncer está más frecuentemente asociada a la diseminación de células tumorales a órganos distantes, que al tumor primario directamente. Aunque la diseminación de células tumorales puede tener lugar mediante diferentes mecanismos, incluyendo invasión local del tejido adyacente o diseminación por el sistema vascular sanguíneo, existen evidencias de que para algunos tipos de tumores, la principal vía de metástasis es la diseminación de células tumorales a través del sistema vascular linfático hacia los ganglios linfáticos próximos al tumor (Stacker et al. 2002). El sistema linfático puede tener por tanto un papel relevante en la progresión tumoral. De hecho, la afectación de los ganglios linfáticos es un marcador importante que permite establecer el pronóstico de la agresividad tumoral (Alitalo et al. 2005, revisado en Karpanen and Alitalo 2008, Cueni and Detmar 2008). Sin embargo, los mecanismos por los cuales esto se produce aún no están completamente caracterizados (Karpanen and Alitalo 2008).

La diseminación de células tumorales mediante el sistema linfático hacia sitios alejados del tumor primario podría producirse por la entrada de estas células a los vasos linfáticos pre-existentes en la zona, o a los vasos de nueva formación tanto peritumorales como intratumorales (Achen 2005; Alitalo et al. 2004, Cao 2004, Cao 2005, Karpanen et al. 2001, Mandriota et al. 2001, Skobe et al. 2001, Stacker et al. 2001). En algunos tumores humanos la presencia de vasos linfáticos intratumorales se correlaciona con la existencia de metástasis linfática y con mal pronóstico (Beasley et al. 2002). Sin embargo, algunos autores ponen en duda que los vasos linfáticos intratumorales contribuyan a la diseminación tumoral pues debido a la alta presión existente dentro del tumor, estos vasos no parecen ser funcionales (Padera et al. 2002, Wong et al. 2005).

Los vasos linfáticos peritumorales, sin embargo, si son plenamente funcionales (He et al. 2002, 2004, Padera et al. 2002) (Figura 4b). La caracterización de diversos modelos animales así como datos procedentes de la observación clínica han puesto de manifiesto que el crecimiento y proliferación de los vasos linfáticos en las proximidades del tumor puede contribuir a la metástasis vía sistema linfático (Achen and Stacker 2008). Sin embargo, este parece ser un proceso esencial para que la metástasis se produzca, de hecho se ha visto que en algunos tumores humanos como cáncer de mama, de páncreas o de próstata, la metástasis a ganglios linfáticos no es un proceso dependiente de linfangiogénesis (Cory et al. 2003, Sipos et al, 2005, wong et al, 2005).

Además la diseminación a través del sistema linfático es más frecuente en algunos tipos de tumores como melanoma o carcinoma pancreático o que en otros, lo que sugiere que este proceso puede depender del tipo de tumor, su localización y la densidad de vasos linfáticos presentes en la periferia tumoral (Sipos et al. 2005, Wong et al. 2005, Williams et al. 2003, Padera et al. 2002).



**Figura 4:** a) Procesos de linfangiogénesis tumoral y metástasis linfática. Las células tumorales y los macrófagos activados pueden expresar VEGF-C y D pueden inducir al crecimiento de los vasos linfáticos tanto en la periferia tumoral, como en el interior del tumor, como en los nódulos linfáticos. Maby-El Hajjami and Petrova, 2008. B) Inmunohistoquímica frente a VEGFR3. Los vasos linfáticos se general en torno a la zona tumoral.

Por otro lado existen evidencias de que los tumores primarios pueden inducir un proceso de linfangiogénesis en los ganglios linfáticos previamente a la llegada de las células tumorales al ganglio dónde la metástasis se va a producir (revisado en Hirakawa 2009). Este hecho supuso la definición de un “nicho linfovascular” que estaría presente en los ganglios linfáticos y supondría el lugar adecuado para la retención y supervivencia de las células metastásicas (revisado en Hirakawa 2009). El proceso de linfangiogénesis en el ganglio, así como el incremento en el flujo de linfa a través de los ganglios linfáticos próximos al tumor, parece ser un proceso dependiente de las células B presentes en el ganglio linfático (Harrel et al. 2007). Además de VEGF-C, uno de los mediadores identificados en este proceso de

linfangiogénesis es VEGF-A, ligando de VEGFR2 y que se encuentra expresado en células B (Angeli 2006).

También se sabe, que las células que forman parte del tumor son capaces de producir factores linfangiogénicos que dan lugar a la dilatación de los vasos linfáticos existentes en la zona de crecimiento del tumor. Algunos de los factores pueden favorecer además el paso de células tumorales al interior de los vasos linfáticos (Alitalo et al. 2004). Además, se ha visto que no sólo las células tumorales sino también los macrófagos activados que han sido reclutados a la zona expresan los factores linfangiogénicos VEGF-C y D por lo que desempeñan un papel importante en los procesos de generación de nuevos vasos linfáticos peritumorales, así como en la diseminación de las células tumorales (Schoppmann 2002) (figura 5).

En todos estos procesos se ha demostrado mediante la utilización de diversos modelos animales la importancia de la vía de señalización VEGFR3/VEGF-C/VEGF-D. Estudios en los que se utilizan tanto xenotransplante como diferentes modelos de ratones transgénicos han demostrado que la expresión de VEGF-C y VEGF-D por parte de las células tumorales induce al crecimiento de nuevos vasos linfáticos, que se localizan principalmente en la periferia tumoral, aunque en algunos modelos también se generan linfáticos intratumorales. La producción de estos factores origina también la dilatación de los vasos linfáticos ya existentes (revisado en Karpanen and Alitalo 2008).

Por otra parte, se ha visto que la inducción de linfangiogénesis tumoral por VEGF-C origina metástasis en algunos tipos de cáncer como el cáncer de mama (Skobe et al. 2001). Y estimula el crecimiento de nuevos vasos linfáticos asociados al tumor. Las células endoteliales linfáticas emiten prolongaciones hacia las células tumorales productoras de VEGF-C dando lugar así a vasos linfáticos directamente dirigidos al tumor y que facilitan el acceso de las células tumorales y por lo tanto su diseminación a órganos distantes (He et al. 2005). Existen también estudios en humano que correlacionan un aumento en la expresión de VEGF-C con los procesos de linfangiogénesis y metástasis linfática, y lo asocian a una baja supervivencia del paciente. (Stacker et al. 2002, He et al. 2004).

En cuanto al receptor, hay evidencias de se produce expresión de VEGFR3 no sólo en los vasos linfáticos sino también en vasos sanguíneos tumorales, por lo que este receptor puede estar contribuyendo además a procesos de angiogénesis tumoral o integridad vascular (Kubo et al. 2000, Petrova et al. 2008).

Además, la participación de la ruta de señalización VEGF-C/VEGF-D/VEGFR3 en progresión tumoral y metástasis se ha estudiado mediante la utilización de formas solubles del receptor que actúan secuestrando a VEGF-D y VEGF-C y suprimen la linfangiogénesis tumoral y la metástasis a ganglios proximales, aunque no evitan la metástasis a pulmón (He et al. 2002, Lin et al. 2005). También se han utilizado anticuerpos frente a VEGFR3 capaces de inhibir la angiogénesis y linfangiogénesis tumoral. (Roberts et al. 2006, Laakonen et al. 2007) o RNA interferente que afecta a la ruta de señalización VEGF-C/VEGF-D/VEGFR3 (Chen 2005). Resultados similares se obtuvieron utilizando anticuerpos anti VEGFR-D (Stacker et al. 2001). Estos datos ponen de manifiesto la importancia de la vía VEGFR3/VEGF-C/VEGF-D en los procesos de progresión tumoral y metástasis.

En resumen, todos estos antecedentes ponen de manifiesto que el sistema vascular linfático tiene funciones muy importantes tanto en condiciones fisiológicas, durante el desarrollo y en el adulto, como en ciertas patologías como el crecimiento y expansión de los tumores y la formación de metástasis. Sin embargo, a pesar de su relevancia, se conoce realmente poco sobre muchos aspectos del sistema linfático como su origen, los mecanismos moleculares que controlan su desarrollo y su función, los procesos que contribuyen a su crecimiento (linfangiogénesis) y su contribución a procesos patológicos. Ello se debe en gran parte a la falta de buenos modelos experimentales, en particular *in vivo*, para abordar su estudio. La identificación de marcadores específicos del endotelio linfático ha sido esencial para el desarrollo de estos modelos.

## OBJETIVOS



El objetivo fundamental de esta tesis es el desarrollo de herramientas genéticas en ratón para el estudio del sistema vascular linfático in vivo, su participación en diferentes procesos tanto fisiológicos como patológicos y especialmente su contribución al crecimiento y expansión tumorales.

Este objetivo se concreta en los siguientes:

- 1.- Generación y caracterización de una línea de ratón modificada genéticamente para expresar un gen trazador específicamente en el endotelio linfático. Esta línea debe permitir el estudio de la linfangiogénesis in vivo mediante técnicas de imagen óptica no invasivas (fluorescencia y luminiscencia).
- 2.- Validación de dicho modelo como un reportero de linfangiogénesis in vivo especialmente en procesos patológicos como inflamación y tumores.
- 3.- Generación y caracterización de una línea de ratón modificada genéticamente que permita la obtención de mutantes condicionales inducibles específicamente en el endotelio linfático.
- 4.- Establecer la relevancia de la señalización por HGF/c-Met en el endotelio linfático mediante la inactivación del gen c-Met específicamente en células endoteliales linfáticas, empleando el modelo descrito en el objetivo 3.





## MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. Construcción del vector de *targeting* Flt4-EGFPluciferasa

Para la construcción del vector de *targeting* se partió del plásmido CNIO131 que posee un casete de resistencia a Neomicina flanqueado por sitios *frt* que procede del plásmido pDELBOY construido en el laboratorio del Dr. Tom Makela de la Universidad de Helsinki. Los clones recombinantes que lo contienen se seleccionan en presencia de Geneticina (Figura 7). Sobre él se realizaron clonajes sucesivos de los distintos componentes del vector. En primer lugar se eliminó un sitio de restricción EcoRI mediante digestión parcial con EcoRI y extensión con Klenow de los extremos 3' generados. De este forma queda un sitio EcoRI único que facilita los clonajes posteriores. Se obtuvo de esta manera el plásmido pIM7.

El casete que expresa el gen de la timidina-quinasa (PGK-TK) del virus herpes simple humano se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pPNT (Tybulewicz et al., 1991). Para ello se utilizaron los oligonucleótidos TK-F y TK-R (tabla II) que fueron diseñados incluyendo sitios de restricción KpnI en los extremos 5' para facilitar el clonaje del casete en el vector pIM7. Estos oligos amplifican un fragmento de 2.3Kb. Una vez amplificado, el producto de PCR se purificó por precipitación con EtOH 100% (2/1 v/v) y acetato sódico 3M (1/10 v/v) y se clonó en pBluescript II KS de Stratagene (pBS) y se secuenció en su totalidad. Una vez verificada la secuencia, el casete se extrajo del plásmido por digestión con KpnI y se clonó en el sitio KpnI de vector pIM7 utilizando para ello un kit de ligación de Takara (*Ligation kit* ver.2.1 #6022). Así se obtuvo el plásmido pIM8.

La secuencia IRES (sitio de entrada interno de ribosomas), procedente del virus de la encefalomiocarditis (ECMV) (Jang et al. 1990; Rees et al. 1996), se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pIRES (Clontech #631605) con los primers IRES-F y IRES-R (tabla II) que amplifican una banda de 500pb y se clonó en pBluescript II KS. Los oligonucleótidos diseñados para esta amplificación contienen sitios de restricción ClaI, NcoI y Sall en los extremos 5' para facilitar el clonaje en el vector pBS y la fusión posterior con la secuencia EGFPluc. La EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) es una variante de la proteína GFP (*Green Fluorescent Protein*), más brillante y optimizada para su expresión en células de mamífero. La fusión entre la EGFP y la luciferasa (EGFPluc) se obtuvo a partir de un plásmido comercial de Clontech (#6169-1) mediante su amplificación por PCR. Los primers utilizados en esta amplificación, EGFP-F y EGFP-R (tabla II), se diseñaron incluyendo sitios de restricción NcoI y Sall en los extremos 5' para llevar a cabo la fusión con el casete IRES y amplifican un fragmento de 2.4Kb. Este fragmento se clonó en pBS y se verificó que la secuencia no era portadora de ninguna mutación. La fusión IRES-EGFPluc se extrajo de pBS por digestión con las enzimas ClaI y Sall y se clonó en pIM8 originando el plásmido pIM9 que posee sitios de restricción NotI y Sall únicos para el clonaje de los brazos de homología.

Finalmente, los brazos de homología se amplificaron mediante PCR a partir de un BAC (RP23-445K3, <http://www.chori.org/bacpac/vectorsdet.htm>) que contiene la secuencia del gen Flt4 procedente de la cepa de ratón C57BL/6. Se utilizaron los oligonucleótidos Flt4-3F y Flt4-3R para la amplificación del brazo 3' y Flt4-5F y Flt4-5R para la del brazo 5' (Tabla II) que incluyen los sitios de restricción NotI, los del brazo 5' y Sall, los del brazo 3'. El tamaño de los brazos de homología es de 3,3 Kb y de 3,7 Kb para los brazos 5' y

3' respectivamente. Después de la amplificación los brazos quedan flanqueados por sitios de restricción NotI (brazo 5') y Sall (brazo 3'). Ambos se clonaron primero en pBS para su secuenciación, verificándose que durante la reacción de PCR no se hubiese introducido ninguna mutación. Posteriormente se extrajeron del plásmido por digestión con las enzimas NotI y Sall y se clonaron en el plásmido pIM9. Una vez clonados los dos brazos de homología (plásmido pIM15), se eliminó del vector resultante un sitio de restricción NotI mediante digestión parcial con NotI y relleno de los extremos con Klenow para dejar un sitio único que permitiese su linearización antes de electroporarlo en células madre embrionarias. El vector con un único sitio de restricción NotI recibe el nombre de pIM16 (vector de *targeting* para Flt4-IRES-EGFPluc). Todas las enzimas de restricción utilizadas en la construcción de los vectores de *targeting* pertenecen a la casa comercial Fermentas. La polimerasa empleada para la amplificación de los distintos componentes del vector es la LA TAQ (*Expand High fidelity*, Takara).

Nombre	Secuencia	Sitio de restricción	Programa de PCR
TK-F	TAA <b>GGT ACC</b> TAC CGG GTA GGG CAG	KpnI	95°C-5min / 95°C-1min, 48°C-1min, 72°C-4min (x 2 ciclos) / 95°C-1min, 68°C-1min, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min
TK-R	TAT <b>GGT ACC</b> CTG ATG GAA TTA GAA CTT G	KpnI	
IRES-F	TTT <b>ATC GAT</b> AAT TCC GGT TAT TTT CCA CC	Clal	95°C-5min / 95°C-1min, 42°C-1min, 72°C-1min (x 2 ciclos) / 95°C-1min, 68°C-1min, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min
IRES-R	TTT <b>GTC GAC ATC CAT GGT</b> ATT ATC ATC GTG TTT TTC	Sall, NcoI	
EGFPluc-F	TTT <b>CCA TGG</b> TGA GCA AGG GCG AGG AGC	NcoI	95°C-5min / 95°C-1min, 50°C-1min, 72°C-4min (x 2 ciclos) / 95°C-1min, 68°C-1min, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min
EGFPluc-R	TTT <b>GTC GAC</b> TTA CAC GGC GAT CTT TCC	Sall	
Flt4-3F (exón 30)	TTT <b>GTC GAC</b> ACC CTC ACC CGC ACA TTC	Sall	92°C-2min / 98°C-10seg, 54°C-1min, 68°C-5min (x 2 ciclos) / 98°C-10seg, 68°C-5min (x 30 ciclos) / 72°C-7min
Flt4-3R (intrón 30)	TTT <b>GTC GAC</b> GGG AAG CAA GAC ACC ACC T	Sall	
Flt4-5F (intrón 29)	TTT <b>GCG GCC GCA</b> GGC TTG GCT GCT TCT CTC	NotI	92°C-2min / 98°C-10seg, 54°C-1min, 68°C-5min (x 2 ciclos) / 98°C-10seg, 68°C-5min (x 30 ciclos) / 72°C-7min
Flt4-5R (exón 30)	TTT <b>GCG GCC GCG</b> CCC TCG TTG TCT GAG TTT G	NotI	
Flt4-3F-Cre (exón 30)	TTT <b>GCG GCC GCA</b> CCC TCA CCC GCA CAT TC	NotI	92°C-2min / 98°C-10seg, 54°C-1min, 68°C-5min (x 2 ciclos) / 98°C-10seg, 68°C-5min (x 30 ciclos) / 72°C-7min
Flt4-3R-Cre (intrón 30)	TTT <b>GCG GCC GCG</b> GGA AGC AAG ACA CCA CCT	NotI	
Flt4-5F-Cre (intrón 29)	TTT <b>GTC GAC</b> AGG CTT GGC TGC TTC TCT C	Sall	92°C-2min / 98°C-10seg, 54°C-1min, 68°C-5min (x 2 ciclos) / 98°C-10seg, 68°C-5min (x 30 ciclos) / 72°C-7min
Flt4-5R-Cre (exón 30)	TTT <b>GTC GAC</b> GCC CTC GTT GTC TGA GTT TG	Sall	

**Tabla II:** Oligonucleótidos empleados en la amplificación de los diferentes elementos que constituyen los vectores de *targeting* Flt4-IRES-EGFPluc y Flt4-CreERT<sup>2</sup> y programas de PCR utilizados para su amplificación

## 2. Construcción del vector de *targeting* Flt4-CreERT<sup>2</sup>

Para la construcción del vector de *targeting* Flt4-CreERT<sup>2</sup> se partió del vector pIM8 (Apartado 1 de Materiales y Métodos) (Figura 7), que contiene los casetes de resistencia a Neomicina (PGK-Neo) y a Ganciclovir (PGK-TK). La fusión IRES-CreERT<sup>2</sup> se obtuvo mediante digestión con las enzimas EcoRI y NotI a partir del plásmido pVC11, y se clonó en el vector pIM8 mediante ligación de extremos romos en un

sitio EcoRI, dando lugar al plásmido pIM10 que posee (al igual que pIM9), sitios de restricción NotI y Sall únicos para el clonaje de los brazos de homología (Figura 7).

Los brazos de homología son los mismos diseñados para el vector Flt4-IRES-EGFPluc. En éste caso debido a la orientación del casete IRES-CreERT2, el brazo 5' está flanqueado por sitios de restricción Sall y el 3' por sitios de restricción NotI, por lo que fue preciso volver a amplificarlos a partir del BAC (RP23-445K3, <http://www.chori.org/bacpac/vectorsdet.htm>) utilizando los oligonucleótidos Flt4-3F-Cre, y Flt4-3R-Cre para la amplificación del brazo 3' y Flt4-5F-Cre y Flt4-5R-Cre para la del brazo 5' (tabla II). Una vez comprobada la secuencia, se clonaron los brazos de homología en pIM10 y se eliminó un sitio de restricción NotI por digestión parcial como se ha descrito anteriormente, obteniéndose el plásmido pIM24 (vector de *targeting* para Flt4-IRES-CreERT<sup>2</sup>)

### 3. Electroporación en células ES

Se utilizan células madre embrionarias de ratón (células ES) de la línea V6.4 de fondo genético híbrido F1(C57BL/6 x 129SvJ). Estas células se cultivan sobre una monocapa de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) previamente tratados con mitomicina-C y resistentes a neomicina (*feeders*). El medio de cultivo utilizado es KODMEM + 200 mM Glutamax-I (Gibco), 0.1 mM 2-mercaptoetanol (Gibco), aminoácidos no esenciales 1X (Gibco), penicilina/estreptomicina 50 U/ml-50 µg/ml (Gibco), LIF 1000 U/ml (Chemicon) y suero fetal bovino 15% (Gibco). Se electroporan  $5,6 \times 10^6$  células ES en 800 µl de PBS ( $7 \times 10^6$  células /ml) con 20 µg del vector de *targeting* en un electroporador BioRad *Gene Pulser II* (240 V y 500 µF). Tras la electroporación se siembran las células en una placa de 10 cm sobre una monocapa de MEFs. 24 horas después se inicia la selección positiva mediante adición de G418 (Gibco) al medio de cultivo a una concentración final de 200 µg/ml. A las 48 horas se inicia la selección con ganciclovir (2 µM). La doble selección se mantiene durante 4 días más con cambio de medio diario. Después de este periodo se seleccionan por morfología y se pican 298 colonias que se tripsinizan individualmente y se transfieren a placas de 96 pocillos con *feeders*. Las colonias se triplican a los dos días; dos de las réplicas se congelan a -80°C, directamente en las placas de 96 pocillos, en 25% FCS y 10% DMSO en DMEM. La tercera réplica se expande a placas de 24 pocillos tratados con gelatina (0.1% en agua) para obtener DNA genómico y realizar el posterior análisis por *southern blot* para la identificación de clones recombinantes homólogos.

### 4. Análisis de clones recombinantes homólogos

La selección de clones recombinantes homólogos se realizó mediante *southern blot*. Para ello se extrajo DNA de las células ES creciendo en placas de 24 pocillos mediante digestión con proteinasa K (Roche) a una concentración de 500 µg/ml en tampón de lisis (NaCl 100mM, Tris-HCl pH 8.0 20mM, EDTA 10mM y SDS 0.5%) durante 12 horas a 55° C. Después de tratar las muestras con una solución de cloruro sódico saturada (>6 M), el DNA se precipitó con isopropanol y se resuspendió en tampón TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0). Una vez extraído, se digirió con 75 unidades de la enzima de restricción Scal

(Roche) durante 12 horas a 37°C añadiendo a la mezcla de digestión albúmina sérica bovina (concentración final 100µg/ml), espermidina (1mM) y RNAsa A (50µg/ml) además del tampón suministrado por el fabricante. El producto de digestión se cargó en un gel de agarosa al 0.8% y se sometió a electroforesis. Posteriormente, se trató el gel según el protocolo descrito (Sambrook and Russell 2001) y se transfirió el DNA a una membrana (*Hybond<sup>TM</sup>*- N+, *Amersham, GE Healthcare*) mediante migración por capilaridad en una solución SSC 10X. Las membranas se sometieron a un tratamiento de entrecruzamiento por radiación ultravioleta (UV *Stratalinker* 1800, *Stratagene*), se bloquearon con solución de prehibridación (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15mM, NaCl 0.9M, EDTA pH 8.0 2.5mM, polivinilpirrolidona 2mM, Ficoll-400 0.8mg/ml, SDS 10mg/ml, sulfato de dextrano 50mg/ml, formamida 50% y DNA de esperma de salmón 0.05mg/ml) durante al menos dos horas a 42°C y se incubaron en solución de hibridación a esa misma temperatura, con la sonda marcada durante toda la noche. El marcaje de la sonda se realizó con α-<sup>32</sup>P-dCTP para ello se utilizó el sistema de marcaje radioactivo comercial *Rediprime<sup>TM</sup>* II (GE Healthcare).

Las sondas utilizadas para el análisis se amplificaron por PCR a partir del BAC que contiene la secuencia de Flt4 (RP23-445K3, <http://www.chori.org/bacpac/vectorsdet.htm>) y se clonaron en el plásmido pGEM-T mediante el sistema *pGEM-T Easy Vector System I* (Promega). Para analizar la recombinación homóloga del brazo 5' se utilizó una sonda de 262 pb generada utilizando los oligonucleótidos: SondaI-Flt4 y SondaI-Flt4R (tabla III). Para el análisis de la recombinación homóloga para el brazo 3' se utilizó una sonda de 324pb generada mediante PCR con los oligonucleótidos: SondaII-Flt4F Y SondaII-Flt4R (tabla III). Ambas sondas reconocen secuencias externas a los brazos de homología de los vectores de *targeting*.

Una vez hibridadas las membranas, estas se lavan dos veces con SSC 1x - SDS 0.1% a 42°C durante 20min. Posteriormente se les da un tercer lavado con SSC 0.2X – SDS 0.1% a 55°C durante 30min. Se dejan secar sobre papel 3MM con el ADN hacia arriba y se introducen en un cassette de exposición (Phospo screen) durante un mínimo de 2 horas. Finalmente se revelan en el Storm (Phosphor imager Amersham).

Nombre	Secuencia	Programa de PCR
Sonda I-Flt4-F	TTT GTC GAC GAA TAC AGA TAC CTA AGC	95°C-5min / 95°C-1min, 51°C-1min, 72°C-2min (x 2 ciclos) / 95°C-1min, 60°C-1min, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min
SondaI-Flt4-R	TTT GTC GAC CCA CAT ATG AGG CTT TCC	
Sonda II-Flt4-F	TTT GTC GAC CAA GCC TCT CAT GTG CAG	
SondaII-Flt4-R	TTT GTC GAC GTC TCA TGG CCA GTA TC	

**Tabla III:** Oligonucleótidos diseñados para la generación de las sondas utilizadas en el análisis de los clones recombinantes homólogos y programa de PCR para su amplificación.

## 5. Incorporación de células ES recombinantes a un embrión en desarrollo

Los clones de células ES identificados como recombinantes homólogos se incorporan a embriones en estadio de mórula temprana mediante la técnica de agregación. Para la realización de ésta técnica, se obtuvieron mórulas a día E2.5 (tomando como día E0.5 la presencia de tapón vaginal) mediante perfusión

con medio M2 (Sigma) del oviducto y el útero de hembras CD1 sometidas a un tratamiento de superovulación y cruzadas con machos fértiles. Se eliminó la zona pelúcida de las mórulas por exposición breve a una solución de Tyrode (Sigma) y se lavaron repetidas veces en medio M2. Luego se colocó cada mórula en un pocillo preparado en una placa de cultivo en gotas de KSOM (*Specialty Media*) cubiertas con aceite mineral (Sigma). Con una pipeta de transferencia se colocó un grupo de 5-10 células ES sobre cada mórula, se incubó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante toda la noche. Al día siguiente las mórulas que incorporaron las células ES y se desarrollaron al estadio de mórula compactada o blastocisto se transfirieron a hembras receptoras pseudo-gestantes que llevaron la gestación a término y dieron a luz camadas en las que se evaluó la presencia de quimeras por análisis de la pigmentación.

## 6. Genotipado de líneas de ratón.

Los ratones utilizados en este estudio se mantuvieron en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) cumpliendo los requerimientos sanitarios y éticos de dicho animalario y fueron sacrificados atendiendo de igual manera a criterios éticos.

Los animales generados a partir del cruce de quimeras con las hembras CD1 se genotiparon por PCR a partir de DNA extraído de la cola del ratón. La extracción de DNA a partir de tejidos de ratón se realizó siguiendo el mismo protocolo que el descrito anteriormente para la extracción de DNA de células ES (Apartado 4 de Materiales y Métodos). Los oligonucleótidos para identificar los animales portadores de la construcción EGFP<sup>Luc</sup> se diseñaron de manera que permitiesen diferenciar entre el alelo silvestre y el alelo recombinante. Para detectar el alelo silvestre se utilizaron los oligonucleótidos Flt4-08F y Flt4-02R que amplifican una banda de 591pb. Y para la detección del alelo recombinante se utilizaron los oligonucleótidos EGFP-F1 y EGFP-R2 que amplifican una banda de 337pb dentro del casete IRES-EGFP<sup>Luc</sup>. La escisión del casete de resistencia a neomicina se analiza por PCR con los oligonucleótidos Flt08F y pBS-IRES-R2 que amplifican una banda de 716b en el caso de que se haya producido la escisión del casete. Para el análisis de los animales con la construcción IRES-CreERT<sup>2</sup> para el alelo silvestre se utilizan los mismos oligonucleótidos que en el caso anterior. Para el alelo escindido se utilizan los oligonucleótidos Flt4-02R y Cre-F3 que amplifican una banda de 562b. La secuencia de cada uno de los oligonucleótidos utilizados en estas PCR, así como el programa de PCR se encuentra reflejada en la tabla IV.

Nombre	Secuencia	Programa de PCR
Flt4-08F	CAC TAT GCT CCG TGT CTT G	95°C-5min / 95°C-30seg, 53°C-30seg, 68°C-45seg (x 30 ciclos) / 72°C-7min
Flt-02R	GTG ACT CTC AGA CAT ATG	
EGFP-F1	CAT GGT CCT GCT GGA GTT C	95°C-5min / 95°C-30seg, 54°C-30seg, 68°C-45seg (x 30 ciclos) / 72°C-7min
EGFP-R2	GAC GAT TCT GTG ATT TGT ATT C	
Flt4-08F	CAC TAT GCT CCG TGT CTT G	95°C-5min / 95°C-30seg, 59°C-1min, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min
pBS-IRES-R2	GAG GAA CTG CTT CCT TCAC	
Flt-02R	GTG ACT CTC AGA CAT ATG	95°C-5min / 95°C-30seg, 52°C-30seg, 72°C-45seg (x 30 ciclos) / 72°C-7min
Cre-F3	CAT GGA GCA TCT GTA CAG CAT GAA G	
ROSA1	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT	94°C-5min / 94°C-30seg, 57°C-45seg, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min
IMR315	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC	
IMR316	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG	
Met12	TTA GGC AAT GAG GTG TCC CAC	94°C-5min / 94°C-30seg, 61°C-30seg, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min
Ap8	CCAGGT GGC TTC AAA TTC TAA GG	

**Tabla IV:** Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los animales portadores de las modificaciones Flt4-EGFP<sup>lacZ</sup>, Flt4-CreERT<sup>2</sup>, Rosa26LSLlacZ y c-metlox y sus correspondientes programas de PCR.

Por otra parte, los animales de fondo desnudo (*nude*, *Nu/J*, de Jackson Laboratories) se genotiparon en función de la presencia o ausencia de pelo, puesto que la ausencia de pelo es originada por la mutación *Foxn1<sup>nu</sup>* en homocigosis. Para el genotipado de la modificación Rosa26LSLlacZ se utilizaron los oligonucleótidos Rosa1, IMR315 y IMR316 que originan una banda de 300pb en el caso del alelo recombinante (Rosa1 y IMR315) o 550pb en el caso del alelo silvestre (Rosa1 y IMR316). Para el genotipado de animales c-Met<sup>lox</sup> los oligonucleótidos Met12 y Ap8 que originan una banda de 300pb para el alelo silvestre y de 380pb para el alelo floxeado (Tabla IV).

## 7. Análisis de expresión mediante *western blot*

Se extrajo proteína total a partir de embriones a día E13.5 de desarrollo embrionario. Los embriones se lavaron en PBS y las proteínas se extrajeron tratando con 1ml de tampón de lisis RIPA (150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Deoxicolato; 0,1% SDS; 50 mM Tris-HCl pH 7,5) que contiene inhibidores de proteasas (2mM PMSF, 20 µg/ml Aprotinina) y con la ayuda de un Politrón para triturar el tejido. Los extractos obtenidos se recogieron en un tubo de 2ml y se centrifugaron a 13.000rpm. Se recogió el sobrenadante (extracto de proteína) y se transfirió a un tubo nuevo. La concentración de proteína se cuantificó por el método de Bradford siguiendo el protocolo descrito en *Sambrook and Russel 2001*.

Se utilizaron 100µg de extracto de proteína total. La separación electroforética se realizó en geles de poliacrilamida-SDS al 7,5% según el protocolo descrito por Laemmli (1970). Una vez separadas se



transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) en un equipo de transferencia en húmedo (BioRad) durante 2 horas a 300 mA. Las membranas transferidas se bloquearon en TPBS (PBS, 0,1% Tween-20) conteniendo 5% de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron en tampón TPBS para retirar el exceso de bloqueante y se incubaron con anticuerpos anti-VEGFR3 (AFL4 de Becton Dickinson) y anti-EGFP (AB3080 Chemicon International) a las diluciones 1:60 y 1:400 respectivamente, diluidos en tampón TPBS durante 1 hora a temperatura ambiente o durante 18 horas a 4°C en agitación orbital. Una vez hibridadas, se lavaron 2 veces en TPBS y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a Alexa-680 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar en TPBS, las membranas se revelaron utilizando el sistema de revelado Odyssey (LiCor).

## 8. Inmunoprecipitación

Todas las inmunoprecipitaciones se realizaron a partir del extracto de proteína total obtenido de embriones a E13.5 debidamente cuantificado. Se inmunoprecipitaron 500-5000µg de la fracción soluble con 2µg de anticuerpo primario (AFL4 de Becton Dickinson) durante 2 horas a 4°C en agitación orbital. A continuación se añadieron 50µl de proteína G-Agarosa (Santacruz Biotechnology) y se incubó de nuevo en una cámara fría en agitación orbital durante toda la noche. El inmunoprecipitado acoplado a la proteína G-Agarosa se lavó 4 veces en tampón de lavado IP (0,1M NaCl; 0,05% NP-40; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) y se resuspendió en 100µl de tampón Laemmli. La separación electroforética y el tratamiento posterior de las muestras se realizó como se ha descrito en el apartado anterior.

## 9. Análisis de expresión mediante *northern blot*

El northern blot para el análisis de ARN mensajero se realizó utilizando protocolos estándar. Se extrajo ARN total a partir de embriones a día de desarrollo E13.5 de los tres diferentes genotipos, silvestre, heteocigoto y homocigoto, mediante extracción con Trizol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones descritas por el fabricante y con la ayuda de un Politrón para triturar el tejido. La concentración de ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro. Se analizaron 15 microgramos de ARN total de cada genotipo que fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa 1% en presencia de 2.2M Formaldehído en MOPS 1X (0.02M MOPS, 0.005M Acetato sódico, 0.001M EDTA). Antes de la electroforesis la cubeta y el peine de electroforesis se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3 horas para inactivar posibles proteasas. Antes de cargar las muestras en el gel éstas se hirvieron a 80°C durante 10min y se pusieron en hielo 1 min. Posteriormente se transfirió el ARN a una membrana de nylon (Amersham, Little Chalfont, UK) mediante migración por capilaridad en una solución SSC 10X. La membrana se hibridó en solución de hibridación (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15mM, NaCl 0.9M, EDTA pH 8.0 2.5mM, polivinilpirrolidona 2mM, Ficoll-400 0.8mg/ml, SDS 10mg/ml, sulfato de dextrano 50mg/ml, formamida 50% y DNA de esperma de salmón 0.05mg/ml) a 42°C con una sonda marcada, durante toda la noche. El marcaje de la sonda se realizó al

igual que para el *southern blot* (Apartado 4 de Materiales y Métodos) con  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP utilizando el sistema de marcaje radioactivo comercial *Rediprime*<sup>TM</sup> II (GE Healthcare).

Como sonda se utilizó un fragmento de 500pb correspondiente a la zona 3'UTR del gen *Flt4* externo al sitio de integración de la fusión IRES-EGFPluc o IRES-CreERT<sup>2</sup>. Se amplificó mediante PCR con los primers F (GCGGCCGCACCCTCACCCGCA) y R (GCGGCCGCAGCAGGAGCTG) que originan un fragmento de 890pb, que se clonó en el plásmido pGEM-T Easy Vector System I (Promega) y posteriormente se extrajo mediante digestión con la enzima de restricción *EcoRI* que libera el fragmento de 500pb utilizado como sonda. La sonda para GAPDH corresponde a un fragmento de 400pb de la secuencia codificante del gen de la GAPDH de rata que se obtuvo mediante digestión del cDNA con las enzimas de restricción *PstI/NcoI*.

El lavado y revelado de las membranas se realiza de la misma manera que lo descrito para el Southern blot (Apartado 4 de materiales y métodos).

## 10. Monitorización de fluorescencia en embriones

Para la monitorización de la fluorescencia emitida por la EGFP en embriones se establecieron cruces entre hembras y machos homocigotos para el alelo *Flt4*-EGFPluc KI y se observó la presencia de tapón vaginal. Los embriones se extrajeron a día E10.5, E12.5 y E13.5 (tomando como día 0.5 aquel en el que se observa el tapón vaginal). Se lavaron extensivamente con PBS y se observaron en un microscopio confocal Leica TCS-SP5. (AOBS) equipado con el software de adquisición LAS AF. Para excitar la EGFP se utilizó un laser de argon de 488nm.

## 11. Determinación de la actividad de luciferasa in vivo

Animales de genotipo silvestre, homocigoto, o heterocigoto para la construcción *Flt4*-EGFPluc y de diferentes edades según el ensayo se anestesiaron por inhalación de isoflurano. Para la inducción de la anestesia se utilizó una concentración de isoflurano inicial del 3%, y para el mantenimiento se utilizó al 1.5%. Una vez anestesiados se les administró D-luciferina (Xenogen XR-1001) a una concentración de 15 mg/ml en PBS mediante una única inyección intraperitoneal. La dosis de luciferina es de 150mg/Kg de peso. Los animales inyectados se observaron en un IVIS Spectrum (Xenogen) adquiriendo imágenes durante 30 segundos de forma continuada hasta alcanzar el máximo de emisión (que se alcanza aproximadamente a los 20 minutos de la administración de la luciferina). La región de interés (ROI) sobre la que se realiza la cuantificación de la emisión de luminiscencia, se define en función del ensayo que se esté realizando. Para tomar las medidas de emisión en cada ensayo se repite la cinética definiendo el área de interés (ROI) en función de lo que se pretenda estudiar y tomando siempre el valor del punto máximo de emisión de luminiscencia en ése área para cada punto.

## 12. Determinación de la actividad de luciferasa *in vitro*

La actividad de luciferasa en extractos de diferentes órganos y tejidos en animales de 4 y 14 semanas de edad se midió utilizando un kit comercial de Promega (E-1501) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

## 13. Ensayo de cicatrización cutánea.

En este ensayo se emplearon 5 hembras de 11-14 semanas de edad y heterocigotas para el alelo Flt4-EGFP<sup>luc</sup>. Los animales se anestesiaron por inhalación de isoflurano 3%-1,5%. Se les afeitó la zona dorsal y se realizó una herida circular en la piel, a una altura media de la zona dorsal, con un punzón de biopsia de 8 mm de diámetro, escindiendo la piel y el panículo carnosos. Se midió la emisión de luciferasa en un IVIS Spectrum como se describe anteriormente (apartado 11 de Materiales y Métodos). En este caso el ROI donde se midió la señal corresponde al área inicial de la herida, para cada ratón en cada punto del ensayo. En paralelo se midió el diámetro de la herida, en orientación vertical (V) y horizontal (H) con un calibre. Para calcular el área en cada punto se multiplicaron las medias  $V \times H$  (Zhang et al. 2004). La cicatrización se representa en cada punto como el tamaño porcentual de la herida respecto al tamaño de la herida a día 0.

Para el estudio de la contribución de la inflamación al proceso de cicatrización, en el mismo ensayo algunos animales (n=7) se trataron con dexametasona (Sigma D1756) a una concentración de 1mg/ml en Etanol y a una dosis de 5mg/Kg de peso administrada mediante inyección intraperitoneal diaria comenzando el tratamiento un día antes de la realización de la herida. Los animales control fueron sólo con vehículo en las mismas condiciones.

Una vez finalizado el ensayo se obtuvo una muestra de piel de la zona de la herida y se fijó en paraformaldehído para su inclusión en bloques de parafina siguiendo protocolos habituales. El recuento de vasos linfáticos generados en la zona de la herida se realizó sobre cortes de parafina en los que los vasos linfáticos se tiñeron mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-VEGFR3 (AFL4 de Becton Dickinson 1:10) (Apartado 25 de materiales y métodos). Como contratinción se utilizó hematoxilina. Se contaron los vasos linfáticos en cada campo 20x comenzando en los bordes de la herida y hacia el exterior. Se analizaron las histologías de 3 animales para cada punto y para cada grupo. El análisis estadístico que se realizó es un análisis de la varianza ANOVA utilizando el software de análisis estadístico Graph pad.

## 14. Inducción de inflamación con Adyuvante Completo de Freund (ACF)

Se trataron un grupo de 7 hembras de 16-18 semanas de edad heterocigotas para la construcción Flt4-EGFP<sup>luc</sup> con dos inyecciones de Adyuvante Completo de Freund (ACF) (Difco Laboratories) emulsificado

en suero fisiológico salino (200µl de ACF + 200µl de PBS) espaciadas por un intervalo de 15 días según el protocolo descrito en Mancardi et al. 1999. Las hembras utilizadas como control fueron tratadas con suero fisiológico salino en las mismas condiciones que las del tratamiento con ACF. Las medidas de emisión de luminiscencia se realizaron según lo descrito en el apartado 11 de materiales y métodos. En este caso la región de interés (ROI) sobre la que se realizaron las medidas corresponde a la zona abdominal de cada animal.

### 15. Ensayo de hipersensibilidad por contacto

Hembras homocigotas (n=5) para el alelo Flt4-EGFPluc de 11 semanas de edad, se pre-sensibilizaron por administración tópica de 50µl de oxazolona (OXA) (Sigma E0753) al 2% en acetona/aceite (4:1 v/v) en el abdomen previamente afeitado. Seis días después (día 0) se indujo la inflamación por administración tópica de 10µl de OXA al 1% (en el mismo vehículo) en la oreja izquierda del animal. La oreja derecha se trató sólo con vehículo como control interno. En paralelo, otro grupo de animales (n=7) de la misma edad y genotipo recibieron un tratamiento con dexametasona (DXT) como se describe en el apartado 13 de Materiales y Métodos además del tratamiento con OXA.

La emisión de luciferasa se midió diariamente empezando a día 0 y durante los seis días siguientes del tratamiento utilizando un IVIS Spectrum (Apartado 11 de materiales y métodos). En este caso el ROI (región de interés) corresponde a la oreja tratada o a la oreja control para cada animal.

Una vez finalizado el ensayo se sacrificaron los animales y las orejas tratadas con OXA y con vehículo se fijaron en formalina al 10% y se procesaron para su inclusión en bloques de parafina. El recuento de vasos linfáticos se realizó sobre cortes de parafina utilizando un anticuerpo anti-VEGFR3 (AFL4 de BD Biosciences 1:10) (Apartado 25 de materiales y métodos). Como contratinción se utilizó hematoxilina. Se contó el número de vasos linfáticos por campo de 20X de cuatro orejas para cada punto y para cada grupo. El análisis estadístico que se realizó es un análisis de la varianza ANOVA utilizando el software de análisis estadístico Graph pad.

### 16. Detección de precursores endoteliales

Para la detección de precursores endoteliales mediante emisión de luminiscencia se cruzaron hembras de genotipo silvestre con machos homocigotos para la construcción Flt4-EGFPluc y se observó la presencia de tapón vaginal. A día E10.5 se verificó la preñez de las hembras mediante emisión de luminiscencia. Para ello se anestesiaron con Isoflurano y se les inyectó luciferina para observarlas en un IVIS Spectrum (Xenogen) como se ha descrito en el apartado 11 de Materiales y Métodos. Una vez verificada la preñez se llevó a cabo un protocolo de hipersensibilidad por contacto similar al descrito en el apartado anterior. Las hembras gestantes se pre-sensibilizaron con OXA 2% en acetona/aceite (4:1 v/v) en el abdomen y posteriormente, a día E16.5, E17.5 y E18.5 se les administró en la oreja izquierda OXA 2% y en la derecha sólo vehículo. A día E19.5 después del nacimiento de las crías se llevó a cabo el análisis de la emisión de luminiscencia. Para ello, se les inyectó luciferina a las hembras y se midió la

emisión de luminiscencia en las orejas hasta que alcanzasen el máximo de emisión (aproximadamente a los 20 minutos desde la inyección de la luciferina), en ese momento se sacrificaron y se tomó la medida de la emisión de luminiscencia sólo de las orejas.

En el ensayo de detección de precursores endoteliales con el modelo Flt4-CreERT2;Rosa26LSLlacZ se cruzaron hembras silvestres con machos homocigotos para la construcción Flt4-CreERT2 y Rosa26LSLlacZ y se observó la presencia de tapón vaginal. A día E10.5 se comenzó el mismo protocolo de hipersensibilidad por contacto que el utilizado para el modelo Flt4-EGFPluc con la pre-sensibilización de OXA 2% en abdomen. A día E13.5 se les administró a las hembras gestantes una única inyección de 5mg de tamoxifeno intraperitoneal. A día E16.5, E17.5 y E18.5 se les administró en la oreja izquierda OXA 2% y en la derecha sólo vehículo. Y a día 19.5 se sacrificaron las hembras y se procesaron las orejas para tinción con X-gal (Apartado 22 de Materiales y Métodos).

## 17. Transfección y establecimiento de las líneas celulares H460mCherry y SW620mCherry.

Las líneas celulares H460 (ATCC N° HTB-177<sup>TM</sup>) y SW620 (ATCC N° CCL-227<sup>TM</sup>) se crecen en medio RPMI (Gibco) con 10%FBS y Penicilina/Estreptomicina 50 U/ml-50 µg/ml (Gibco). 2.10<sup>6</sup> células se transfectaron con 6µg del vector de expresión de la proteína fluorescente m-Cherry (pmCherry-C1 Clontech #632524) mediante el sistema de transfección lipofectamine2000 (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La transfección se llevó a cabo en frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup> de superficie. Las células transfectadas se cultivaron en presencia de 400µg/ml G418 durante 3-4 semanas cambiando el medio 3 veces por semana hasta la obtención de un “pool” estable (las colonias no crecen de manera aislada). Posteriormente se seleccionó un pool de células con niveles elevados de expresión de la proteína fluorescente mediante la utilización de un FACS-Sorter (Aria BD).

## 18. Ensayos de Xenograft.

Para estos ensayos se utilizaron hembras heterocigotas para Flt4-EGFPluc y homocigotas para Nu (Foxnl<sup>nu</sup>) excepto para los ensayos con células B16-V5 para los cuales se emplearon hembras heterocigotas para Flt4-EGFPluc de la generación N5 de retrocruzamiento en fondo C57BL/6J. En todos los casos las hembras tenían alrededor de 12 semanas de edad y las células tumorales se inyectaron vía subcutánea en el dorso de cada animal. Se inyectaron 5x10<sup>5</sup> células de la línea B16-V5 y 5x10<sup>6</sup> células de las líneas SW620-mCherry y H460-mCherry

Para las líneas celulares transfectadas con m-Cherry, se realizó un seguimiento in vivo del crecimiento tumoral a lo largo del ensayo mediante detección de la emisión de fluorescencia por parte del tumor). En paralelo se monitorizó el desarrollo de metástasis in vivo por emisión de fluorescencia en los ganglios linfáticos proximales y distales al tumor. La emisión de fluorescencia se analizó mediante la utilización de un IVIS200 (Xenogen) utilizando los filtros para la detección de fluorescencia de mCherry. El seguimiento in vivo de los procesos de linfangiogénesis asociados al crecimiento tumoral se realizó por medición de la

emisión de luminiscencia en el IVIS200 tras la inyección de luciferina tal y como se describió en apartados anteriores. El área de interés definido para este análisis corresponde por un lado a la zona tumoral y por otro a los ganglios linfáticos proximales y distales.

El volumen de los tumores se calculó utilizando la fórmula del volumen del elipsoide  $A \times b^2 \times 0.52$  siendo "A" el diámetro mayor y "b" el diámetro menor. El punto final del ensayo se determinó en el momento en el que el volumen tumoral alcanzó los 1000-1200mm<sup>3</sup>.

### 19. RT-PCR

El análisis de la expresión de los miembros de la familia de VEGF (A, B, C, D) en tumores y en líneas tumorales se realizó mediante RT-PCR. La extracción de ARN mensajero total de los tumores originados por las líneas H460mCherry y SW620mCherry se llevó a cabo en Trizol (Invitrogen). Del ARN extraído, 2µg se retro-transcribieron mediante la reacción con la transcritapsa reversa M-MLV (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Como control de carga se utilizó el cDNA que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de rata (GAPDH). El análisis por RT-PCR se realizó siguiendo los protocolos y condiciones descritas en Yulong He et al. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 94 No11, June 5, 2002, utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla V.

Nombre	Secuencia	Programa de PCR	Tamaño
VEGF-A F	CAT CAC GAA GTG GTG AAG TT	95°C-5min / 95°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min	579pb
VEGF-A R	CTT GTC ACA TCT GCA AGT ACG		
VEGF-B F	AGA TGT GTA TAC TCG CGC TA	95°C-5min / 95°C-1min, 58°C-1min, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min	498pb
VEGF-B R	CCC TTG GCA ACG GAG GAA GCT		
VEGF-C F	CCA GTG TAG ATG AAC TCA TG	95°C-5min / 95°C-1min, 52°C-1min, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min	584pb
VEGF-C R	AGC CAG GCA TCT GCA GAT GT		
VEGF-D F	TGT AAG TGC TTG CCA ACA GC	95°C-5min / 95°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min	448pb
VEGF-D R	AGC GGC AAT GCT TTG CAC AT		
GAPDH F	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC	95°C-5min / 95°C-1min, 55°C-1min, 72°C-1min (x 30 ciclos) / 72°C-7min	900pb
GAPDH R	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC		

**Tabla V:** Oligonucleótidos, programa de PCR y tamaños obtenidos en la RT-PCR de los distintos miembros de la familia VEGF

### 20. Carcinogénesis química

Los ensayos de carcinogénesis química se llevaron a cabo por administración tópica de DMBA/TPA siguiendo el protocolo descrito en Sotillo et al 2001. Se trataron machos y hembras homocigotos para Flt4-EGFP<sup>luc</sup>. El tratamiento se inició a los 7 días de edad mediante la aplicación tópica de 0.5 mg de DMBA (5mg/ml en acetona) en el dorso de cada animal. Posteriormente, a partir de los 15 días de edad se administraron 5µg de TPA (0.025mg/ml en acetona) tres veces por semana durante un total de 15 semanas.

El tratamiento se realiza de forma continuada durante las 4 primeras semanas. Posteriormente entre cada semana de tratamiento se intercala una semana de descanso. Debido a la naturaleza carcinogénica del tratamiento los animales sólo pueden sacarse de la celda destinada a este tipo de tratamientos después de una semana de descanso, en la que no se expongan a carcinógenos, tras la cual se puedan realizar con seguridad las medidas de emisión de luminiscencia en el IVIS Spectrum.

Una vez finalizado el tratamiento se procesaron los papilomas para su análisis mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti Lyve1 (ad14917) (Materiales y métodos apartado 25)

## 21. Tratamientos con Tamoxifeno

Para administración mediante inyección intraperitoneal el tamoxifeno (Sigma T5648) se preparó a una concentración de 20mg/ml en Aceite (qué aceite)/Etanol 9:1. Para su completa disolución se sonicó 3 veces, cada una de un minuto de duración y con una amplitud del 30%. Se prepara cada vez la cantidad de tamoxifeno necesaria para cada tratamiento, sin almacenar de un día para otro. La dosis de tamoxifeno administrada varía en función del ensayo realizado. En el caso del tratamiento intraperitoneal a hembras gestantes hay que tener en cuenta que debido a la naturaleza hormonal del tratamiento las hembras no tienen parto natural, por lo que es preciso recuperar las crías mediante cesárea y ponerlas en adopción con madres nodrizas.

Para el tratamiento mediante dieta, se utilizó un pienso que contiene 0,4mg TAM/g de pienso (*Harlan Laboratories*). Previo a la administración del pienso con tamoxifeno, los animales se mantuvieron 10 días con una dieta de transición. Se ensayaron distintos tiempos de duración para este tratamiento, siendo suficiente para la inducción de una recombinación eficiente el tratamiento de 5 semanas aunque se puede prolongar el tratamiento hasta 12 semanas.

Una vez finalizados los tratamientos con tamoxifeno los tejidos se procesaron para su análisis histológico mediante tinción con X-Gal (Apartado 22 de Materiales y métodos).

## 22. Tinción con X-GAL *whole mount*

El tejido a teñir o una porción del mismo se introduce en la solución de fijación (0.2% glutaraldehído, 1,5% Paraformaldehído, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA, 0,1M Buffer fosfato pH7.2) durante unos 90-120 minutos según el grosor del tejido. Después de fijar el tejido, se hacen dos lavados, de 30 min cada uno, con solución de lavado (0,2% Nonidet P-40, 0,01% Deoxicolato Sódico, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1M Buffer fosfato pH7.2). A continuación el tejido se introduce en la solución de tinción (5mM Ferrocianuro potásico, 5mM Ferrocianato potásico, 1mg/ml X-Gal (Vennova), 0,2% Nonidet P-40, 0,01% Deoxicolato Sódico, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1M Buffer fosfato pH7.2, previamente precalentada a 37°C y se deja durante un mínimo de 24horas a 37°C. Una vez teñido, el tejido se somete a tres lavados de 10 minutos cada uno con la solución de lavado y se introducen en formalina toda la noche. Al día siguiente se realizan dos lavados, de 5 minutos cada uno, con PBS y dos lavados con etanol 50% de 30 minutos de duración. Las muestras se



introducen en casetes para su inclusión en bloques de parafina y se lavan con etanol 70% en agua durante 2 horas.

A continuación los tejidos fueron deshidratados siguiendo un protocolo convencional de concentraciones de etanol y 2-propanol (2x 60min EtOH 95%, 2x60min EtOH 100%, 2x60min 2-propanol 100%, 2x60min 2-propanol/parafina precalentada a 60°C y 2x60min parafina). Se utiliza 2-propanol en lugar de xilol porque éste disuelve el precipitado de X-Gal. Una vez incluidos en bloques de parafina, se cortaron secciones de 4µm y se tiñeron con *Nuclear Fast Red* para dar contraste.

Las imágenes correspondientes a la tinción *whole mount* se tomaron en una lupa DM12 (Leica) previamente a la introducción de las muestras en casetes para su inclusión en bloques de parafina.

### 23. Tinción con X-GAL en crio-cortes

Los tejidos se introdujeron directamente en medio de inclusión para criostato (OCT Tissue-Tek) sobre nieve carbónica y se mantuvieron a -80°C. Una vez congelados se realizaron cortes de 8-10µm de grosor utilizando un criostato (Leica 1900-1-1). Los cortes se recogieron en portas de vidrio (*Superfrost Thermo scientific* 6776213) y dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se introdujeron en solución de fijación (0.2% glutaraldehído, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EGTA, 0,1M Buffer fosfato) durante 10 minutos en una jarra Copling. Una vez fijados se lavaron dos veces, 30 min cada una, con solución de lavado (0,02% Nonidet P-40, 0,01% Deoxicolato Sódico, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1M Buffer fosfato pH7.2, con agitación suave y se introdujeron en la solución de tinción (5mM Ferrocianuro potásico, 5mM Ferrocianato potásico 1mg/ml X-Gal ( Vennova), 0,02% Nonidet P-40, 0,01% Deoxicolato Sódico, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1M Buffer fosfato pH7.2, donde se mantuvieron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 20 minutos cada uno con solución de lavado y 4 lavados de 10 minutos en PBS. Finalmente se realizó una contratinción con *Nuclear Fast Red*.

### 24. Inmunofluorescencia

Los tejidos se introdujeron directamente en medio de inclusión para criostato (OCT Tissue-Tek) sobre nieve carbónica y se mantuvieron a -80°C. Se realizaron cortes en criostato de 8-10 µm de grosor y se recogieron en portas de vidrio (*Superfrost Thermo scientific* 6776213). Los cortes se dejaron secar 1 hora a temperatura ambiente. A continuación se fijaron durante 10min en acetona y se dejaron de nuevo secar durante al menos dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente se utilizó un lápiz de lípidos (Dako S200230-2) para delimitar el tejido en el porta y se bloqueó durante 10min con suero fetal bovino (FBS). Tras el bloqueo, se eliminó el suero y se añadió directamente el anticuerpo primario diluido en 10% de FBS en PBS. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-VEGFR3 (BD Pharmigen 1:10), anti-Lyve1 (UPSTATE 1:100) y anti-CD31 (1:100). La incubación con el anticuerpo primario se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizaron 2 lavados de 5min con PBS en agitación y se añadió en oscuridad el anticuerpo secundario Alexa 555 anti-rata y Alexa 680 anti-conejo a la dilución de 1:400 diluidos en 10% de FBS en PBS. Después de incubar 30min se realizaron 2 lavados con PBS sin agitación y se montó la preparación con Mowiol (Sigma 32459-0).



## 25. Inmunohistoquímica

Los tejidos se introdujeron en formalina hasta su completa fijación (12-24h). Posteriormente fueron deshidratados siguiendo un protocolo convencional de concentraciones de etanol y 2-propanol (2x 60min EtOH 95%, 2x60min EtOH 100%, 2x60min Xilol 100%, 2x60min Xilol/parafina precalentada a 60°C y 2x60min parafina).

Se realizaron cortes de parafina de 2.5 µm de espesor y se desparafinaron en una estufa durante un mínimo de 1 hora a 55°C. A continuación se realizó una recuperación antigénica inducida por calor con buffer citrato pH 6.1 (Dako S1699) o Tris-EDTA pH9 (Dako S2375) según la recomendación del fabricante para cada anticuerpo. Posteriormente se introdujeron los cristales en un autostainer para la inmunohistoquímica (autostainerLink48 DAKO). Como anticuerpos primarios se utilizaron Lyve1 (ad14917) a una dilución 1:100, VEGFR3 (552857 BD) a dilución 1:10 y Cd31 (ab28364) dilución 1:100. Y como anticuerpos secundarios se utilizaron un Rabbit anti-rat biotinilado (DAKO EO468) y un goat anti-rabbit HRP (DAKO PO448).

La contratinción se realizó con hematoxilina-eosina en los tejidos fijados en formalina o con *Nuclear Fast Red* para los tejidos procesados para la tinción con X-gal.



## RESULTADOS

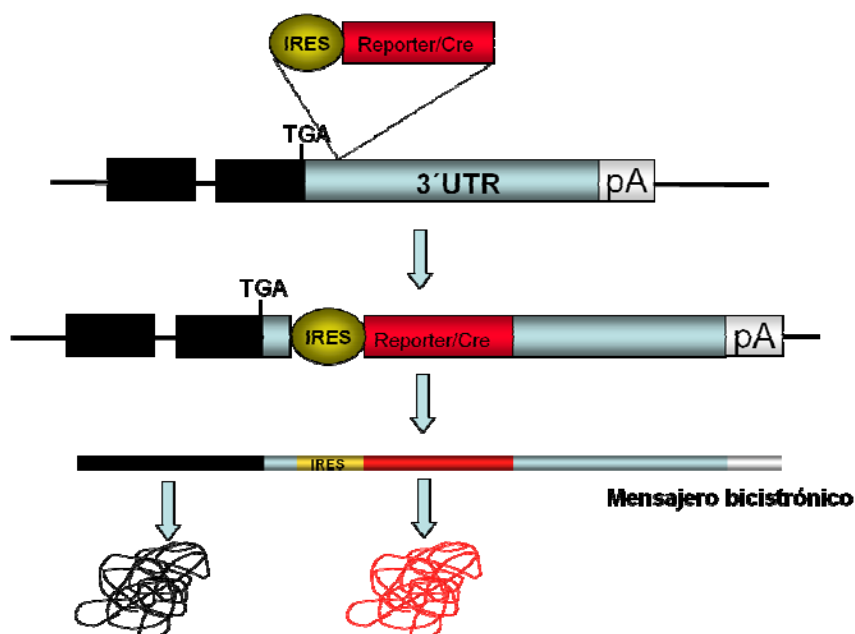


## Parte I: Generación, caracterización y aplicaciones del modelo Flt4-EGFPluc

### 1. Generación de la línea Flt4-EGFPluc

El primer objetivo de este trabajo es la generación de un modelo murino que permita el estudio *in vivo* de los vasos linfáticos y de la linfangiogénesis mediante técnicas de imagen no invasivas. Este modelo ha de estar basado en el marcaje específico de células endoteliales linfáticas con trazadores moleculares que puedan ser detectados mediante técnicas de fluorescencia o luminiscencia *in vivo*, en el animal completo. Además el marcador molecular debe inducirse en procesos de formación de nuevos vasos linfáticos. Para la generación de un modelo con estas características se eligió como molécula trazadora una fusión entre la proteína verde fluorescente, EGFP, y la proteína luciferasa (EGFP-luc) cuya expresión puede ser monitorizada tanto por fluorescencia como por luminiscencia, ampliando el rango de estudios para los que el modelo puede ser utilizado. La fluorescencia presenta una mayor utilidad para la visualización a nivel celular mientras que la luminiscencia es más adecuada para su detección y cuantificación en el animal completo.

Con objeto de dirigir la expresión de este marcador específicamente al endotelio linfático se decidió utilizar las señales reguladoras de la transcripción endógenas del gen Flt4 (VEGFR3), que como se describe en la introducción (Apartado 4.2) es uno de los mejores marcadores descritos de endotelio linfático. Además este gen tiene un nivel bajo de expresión en vasos linfáticos adultos pero su expresión se induce en procesos de linfangiogénesis, por lo tanto es un buen reporter de este tipo de procesos *in vivo*.

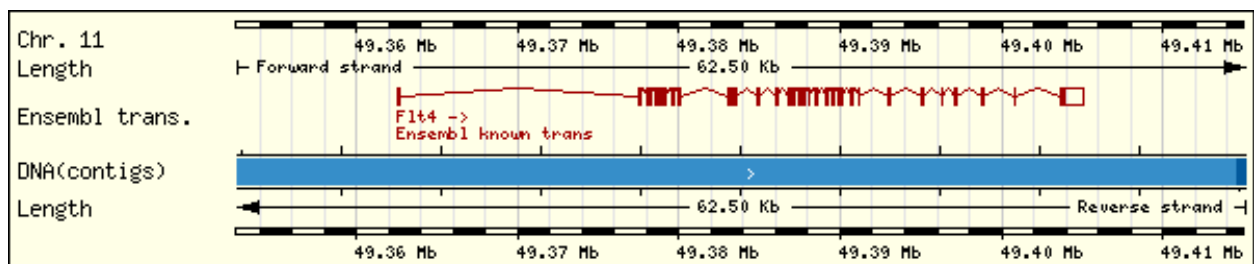


**Figura 5:** Estrategia de generación de un mRNA bicistrónico. Introducción en la región 3'UTR del gen Flt4 (en negro) de una secuencia IRES seguida de la secuencia del cDNA de la proteína que se quiera expresar (en rojo). El cDNA se introduce entre el codón de terminación (TGA) y la secuencia de poliadenilación (pA)

## 1.1 Construcción del vector de *targeting*

Para expresar la proteína trazadora EGFP<sub>luc</sub> bajo el control de las señales de expresión endógenas del gen *Flt4* se empleó una estrategia de *gene targeting* para construir un mensajero bicistrónico codificante de ambas proteínas, VEGFR3 y la molécula trazadora EGFP<sub>luc</sub>, bajo el control de las secuencias reguladoras de la transcripción del gen *Flt4*. Para ello se introdujo en la región 3' no traducida (3'UTR) del gen *Flt4* una secuencia de entrada interna de ribosomas (IRES) seguida de la fusión EGFP<sub>luc</sub>. De este modo se genera un RNA bicistrónico que codifica las dos proteínas VEGFR3 y EGFP<sub>luc</sub> sin modificar la secuencia codificante del gen *Flt4*. Esta misma estrategia se utilizó para la construcción del modelo *Flt4-CreERT*<sup>2</sup> que se describe en el apartado 4.1 de Resultados. El esquema general de esta estrategia se representa en la Figura 5 para ambas construcciones.

El gen *Flt4* murino se encuentra localizado en la región B1.2 del cromosoma 11 y tiene un tamaño de 62.5 Kb. Está formado por 30 exones y 29 intrones y en ratón se transcribe un único mensajero (Figura 6).



**Figura 6:** Estructura genómica del gen *Flt4* de ratón (ENSEMBL ID: ENSMUSG00000020357). Se muestra la estructura de exones e intrones así como el único mRNA mensajero que codifica (en rojo).

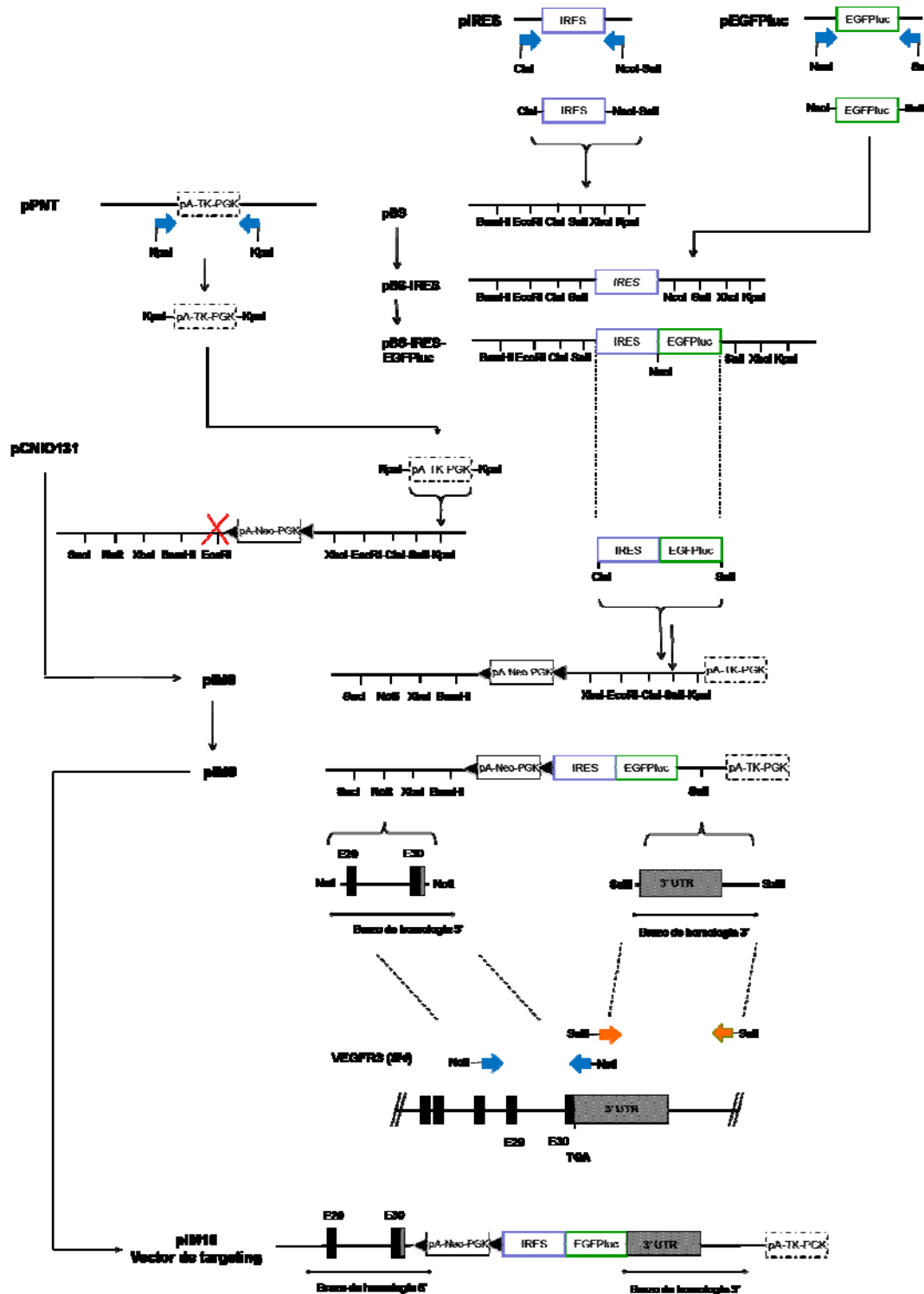
Para la construcción del alelo *Flt4*-EGFP<sub>luc</sub> el cDNA de la fusión IRES-EGFP<sub>luc</sub> se insertó 168 nucleótidos en la dirección 3' del codón de terminación del gen *Flt4*, minimizando así la modificación de la región 3' no traducida endógena de *Flt4* y sin afectar la secuencia de poliadenilación del mensajero.

Los detalles de la construcción del vector de *targeting* (pIM16) se describen en Materiales y Métodos (Apartado 1) y el esquema de la misma se representa en la Figura 7.

El casete de selección positiva, PGK-neo expresa el gen de resistencia a neomicina, neomicina fosfotransferasa, bajo el control del promotor del gen que codifica para la fosfoglicerato quinasa de ratón (PGK). Este marcador se encuentra flanqueado por sitios *frt* para su posterior eliminación mediada por la recombinasa F<sub>1</sub>p (Rodríguez, 2000). Para selección negativa se utilizó el casete que expresa el gen de la timidina quinasa del virus *herpes* (hsvTK) también bajo el control del promotor PGK procedente del plásmido pPNT (Tybulewicz et al. 1991). Su pérdida se selecciona en presencia de ganciclovir. Estos dos marcadores permiten la selección de los clones que hayan incorporado el vector mediante recombinación homóloga. La inclusión del marcador de selección negativa proporciona un aumento de 5-10 veces en la frecuencia de clones recombinantes homólogos.

Los tamaños de los brazos de homología en el vector de *targeting* son de 3,3 y 3,7 Kb respectivamente. El análisis de la secuencia alrededor del sitio de *targeting* en el locus *Flt4* (se han

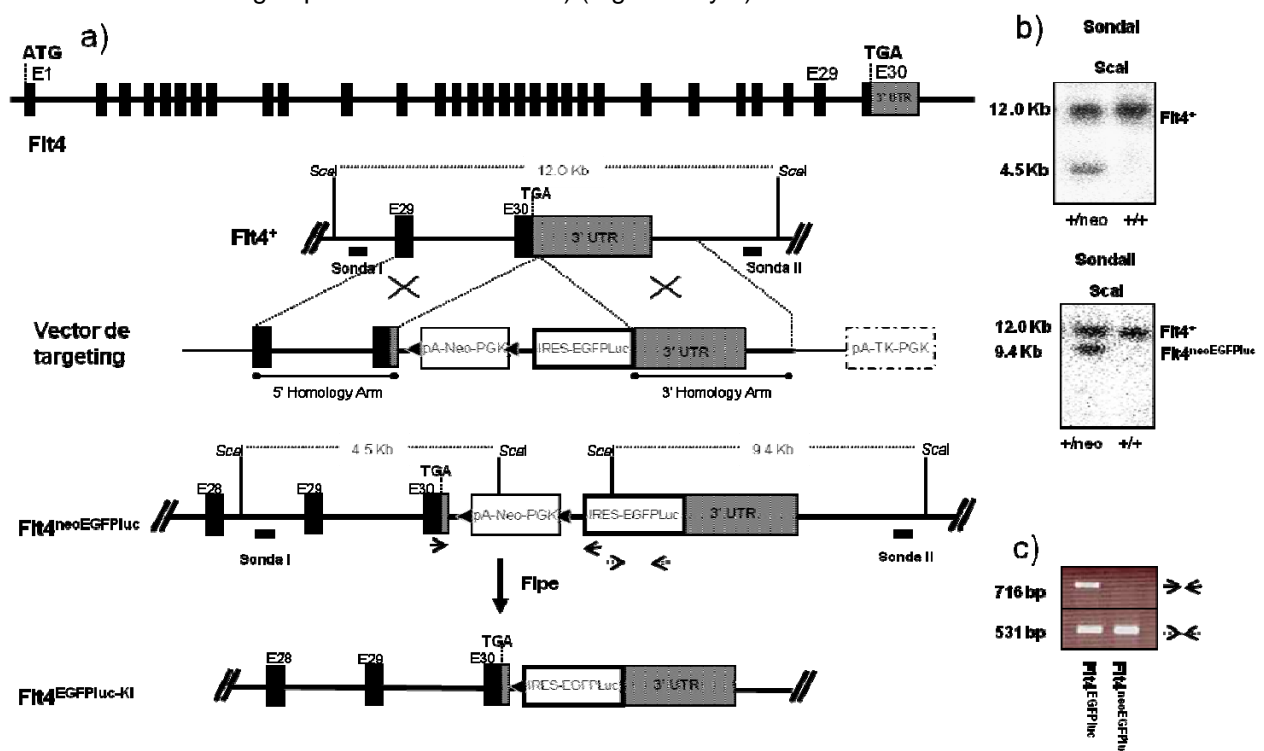
analizado aproximadamente 8 Kb de secuencia genómica 5' y 3' de esta zona respectivamente) permitió concluir que en las secuencias incluidas en los brazos de homología no existen secuencias repetitivas, regiones con estructuras secundarias extensas o con un contenido en G/C anómalo que puedan dificultar la amplificación de los brazos por PCR o, posteriormente, la frecuencia de recombinación homóloga.



**Figura 7:** Esquema de la construcción del vector de *targeting* para la generación del modelo Flt4-EGFP luc. Se representan de forma esquemática los clonajes de cada una de las partes que componen el vector, así como el vector de *targeting* universal pM10 y el vector de targeting definitivo, pM16, para la elaboración del modelo Flt4-EGFP luc.

## 1.2 Obtención de clones recombinantes homólogos

Construido el vector, éste se linearizó por digestión con NotI y se introdujo en células ES de la línea V6.4 (F1C57BL/6x129) mediante electroporación. El protocolo de electroporación y de selección de clones se describe en Materiales y Métodos (Apartado 3). La identificación de clones recombinantes homólogos se llevó a cabo mediante análisis por *southern blot*. Para ello, se diseñaron dos sondas externas a los brazos de homología, una para el brazo 5' de 262pb (Sonda I) y otra para el brazo 3' de 324pb (Sonda II) que se obtuvieron por amplificación mediante PCR a partir de ADN genómico de B6 utilizando las parejas de oligonucleótidos SondaI-Flt4-F/SondaI-Flt4-R y SondaII-Flt4-F/SondaII/Flt4-R respectivamente. El ADN genómico extraído de los clones se digirió con la enzima ScaI. El tamaño de los fragmentos obtenidos por hibridación con la sonda era de 12Kb y 4.5Kb para el alelo WT y el alelo recombinante respectivamente. De igual modo, el tamaño de bandas esperado en la hibridación con la sondaII era de 12Kb y 9.4Kb para los alelos WT y recombinante respectivamente. Se analizaron un total de 60 clones de los cuales 18 resultaron positivos para ambos brazos de homología (frecuencia de recombinación homóloga aproximadamente 30%) (Figura 8a y b).



**Figura 8:** Generación del modelo Flt4-EGFP luc: estrategia de gene *targeting*. a) Esquema de la estructura del gen Flt4, el vector de gene *targeting* utilizado y el alelo obtenido por recombinación homóloga en células ES. Se muestra además la posición de los sitios de restricción ScaI utilizados en el análisis por *southern blot* de los clones recombinantes así como la posición de los fragmentos de ADN empleados como sondas en dicho análisis. Finalmente se muestra la estructura del alelo recombinado una vez eliminado el casete de selección positiva (PGK-neo) mediante la actividad de la recombinasa Flp.

b) Análisis de clones recombinantes mediante *southern blot*. Se muestra el tamaño de las bandas correspondientes a los alelos silvestre (Flt4+) y recombinante (Flt4-neo-EGFP luc)

c) La escisión del casete PGKneo por la recombinasa Flp fue analizado mediante PCR con los oligonucleótidos indicados en la Figura A. Con flechas discontinuas se indican los oligonucleótidos empleados para identificar los clones portadoras del casete Neo-EGFP luc, y con flechas negras se indican los que hayan escindido el casete de resistencia a Neomicina.



### 1.3 Generación de quimeras

Dos de los clones recombinantes homólogos, ESIM4.31 y ESIM4.52, que mostraban un cariotipo euploide (40 cromosomas en metafase) y morfología de células pluripotentes, se incorporaron a embriones en estado de mórula temprana mediante la técnica de agregación, tal y como se detalla en el apartado 4 de Materiales y Métodos para la generación de quimeras. Se generaron 10 quimeras a partir de los dos clones recombinantes (Tabla V). El porcentaje de quimerismo indica la contribución al embrión de las células ES que se han agregado, utilizando como criterio de % de pigmentación en el pelo. Las células ES proceden de una línea de fondo genético híbrido que tiene pigmentación agouti (A/a). Al realizar la agregación sobre mórulas procedentes de la línea CD1, albina, se puede analizar en las crías el porcentaje de pigmentación agouti en la piel que se correlaciona con la contribución de las células ES agregadas (% quimerismo). Para el clon ESIM4.31 se obtuvieron 5 quimeras macho (M) con diferentes % de contribución, mientras que para el clon ESIM4.52, se obtuvieron 5 machos todos con un 100% de contribución de las células ES (Tabla V).

Clon	nº cel agregadas	nº emb. agregados transferidos	nº de crias vivas	nº de quimeras	Sexo (% quimerismo)
ESIM4.31 (p4)	4 a 10	65	8	5	1M (100%), 1M (70%), 2M (50%), 1M (30%)
ESIM4.52 (p4)	4 a 10	124	6	5	5M (100%)

**Tabla V:** Resultado de la incorporación de los clones recombinantes homólogos ESIM4.31 y ESIM4.52 a embriones en desarrollo mediante la técnica de agregación. En la tabla se indican entre otros datos, el número de quimeras y el grado de quimerismo de cada una para cada clon.

Para analizar la contribución de las células ES a la línea germinal en las quimeras se cruzaron varias quimeras procedentes de cada clon con hembras CD1 y se observó la aparición de crías pigmentadas en la descendencia. De las 6 quimeras testadas, todas ellas transmitieron la pigmentación a su descendencia (Tabla VI). Para comprobar la presencia del alelo recombinante Flt4-EGFPluc-neo en la descendencia de las quimeras se genotiparon un total de 68 crías pigmentadas por PCR utilizando para ello los oligonucleótidos Flt4-08F/Flt4-02R y EGFP-F1/EGFP-R2 que amplifican fragmentos de tamaños 591 y 337 en los alelos WT y recombinante respectivamente (Apartado 6 de Materiales y Métodos) . De las crías analizadas 20 poseían el alelo recombinante (Tabla VI).

Clon	%pigmentación de la quimera	nº de crías	Transmisión de pigmentación (%)	Transmisión de la construcción (%)
ESIM4.31 (p4)	(1) 100%	23	23/23 (100)	7/23 (31)
	(1) 30%	13	3/13 (23)	0/3 (0)
ESIM4.52 (p4)	(5) 100%	45	45/45 (100)	13/45 (29)

**Tabla VI:** Análisis de la transmisión de las quimeras de mayor porcentaje de quimerismo. Número de crías analizadas y porcentajes de transmisión de la pigmentación y de la construcción para cada clon.

### 1.4 Eliminación *in vivo* del casete de selección PGK-Neo

Los animales portadores del alelo recombinante Flt4-EGFPluc-neo en heterocigosis se cruzaron a su vez con la línea transgénica Tg.pCAG-Flpe, que expresa la recombinasa Flpe bajo el control del promotor híbrido pCAG (promotor de beta.actina y enhancer de citomegalovirus) (Nat Genet 25, 139 (2000)). Esta línea transgénica expresa la recombinasa Flpe de forma ubicua, incluida la línea germinal. La recombinasa Flpe, induce la recombinación entre los sitios Frt que flanquean el casete PGK-neo de la construcción, produciendo así su eliminación tal y como se muestra en la Figura 8.a y originando el alelo *knockin* (Flt4-EGFPluc). La delección del casete se comprobó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Flt4-08F y PBS-IRES-R2 indicados en la figura 8c, que amplifican un fragmento de 716pb en el caso del alelo recombinado mientras que si está presente el casete PGK-neo amplificarían un fragmento de 2.5Kb (Figura 8x). Aproximadamente un 30% de las crías analizadas presentaban escisión del casete PGKneo. Crías heterocigotas para el alelo Flt4-EGFPluc se cruzaron entre sí para generar el alelo en homocigosis. La frecuencia de animales homocigotos nacidos de estos cruces fue del 25%, indicando que la mutación en homocigosis no resulta en letalidad embrionaria o perinatal.

## 2. Caracterización de la línea Flt4-EGFPluc

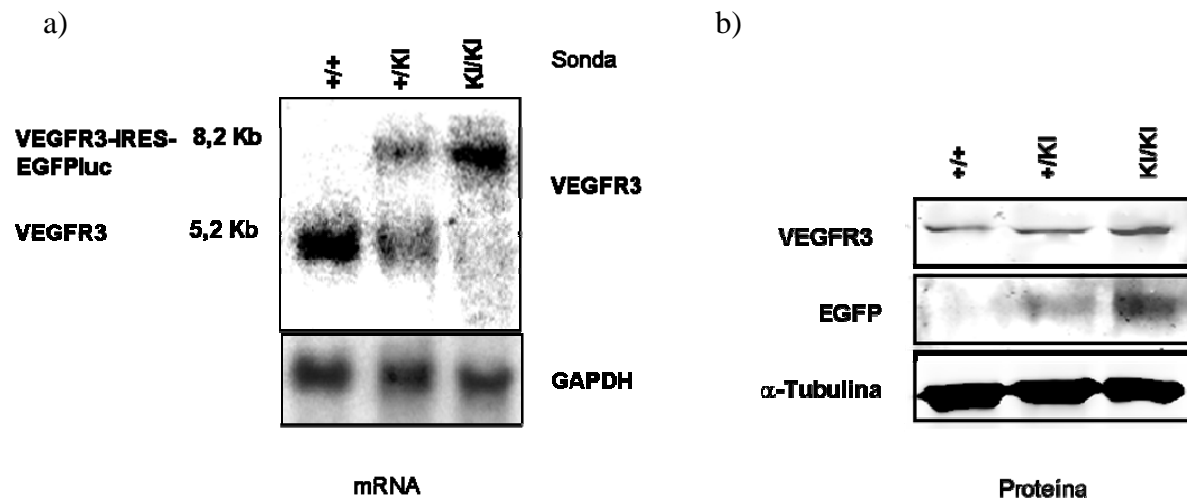
### 2.1 Análisis de expresión de Flt4

Una vez establecida la línea portadora de la construcción Flt4-EGFPluc, se llevó a cabo un análisis de expresión a nivel de RNA mensajero y de proteína de VEGFR3 con el objetivo de comprobar si la introducción de la secuencia IRES-EGFPluc en la región 3'UTR afectaba o no a los niveles de expresión fisiológicos del gen Flt4.

El análisis de expresión del RNA mensajero por *northern blot* se llevó a cabo en embriones de E13.5 días de desarrollo de genotipo silvestre, heterocigoto y homocigoto para Flt4-EGFPluc (Materiales y Métodos. Apartado 9). Como sonda se utilizó un fragmento de 500pb correspondiente a la zona 3'-UTR del gen Flt4 externo al sitio de integración de la fusión IRES-EGFPluc. El tamaño esperado para el RNA mensajero del locus Flt4 es 5.2Kb para el alelo silvestre y 8.2 Kb. para el alelo Flt4-EGFPluc. El tamaño y la intensidad de las bandas obtenidas son los esperados para cada uno de los genotipos analizados indicando que no se produce una alteración notable en la expresión de Flt4 en cuanto a niveles de RNA mensajero. Como control de carga se utiliza una sonda para GAPDH (Figura 9a).

El análisis de los niveles de proteína VEGFR3 se hizo por inmunodetección de proteínas en filtro (*western blot*). El *western* se realizó con 100µg de extracto total de proteína obtenido a partir de embriones de E13.5. Se observó que los niveles de VEGFR3 permanecen constantes en los diferentes genotipos analizados. Al mismo tiempo, utilizando anticuerpos frente a EGFP, se pudo comprobar que existe una relación lineal entre los niveles de EGFP y la dosis génica del animal en los diferentes

genotipos. Estos resultados indican que la introducción de la construcción IRES-EGFPluc no afecta a los niveles de expresión fisiológicos del gen Flt4 (Figura 9b).



**Figura 9.** Análisis de la expresión de VEGFR3 en embriones de 13.5 días de desarrollo. a) *Northern blot*. Se obtienen las bandas correspondientes al alelo silvestre y knockin según lo esperado para cada genotipo. Como control de carga se muestra GAPDH. b) *Western blot*. Se utilizan anticuerpos frente a VEGFR3, EGFP y tubulina como control de carga. La intensidad y tamaño de las bandas es la esperada para cada genotipo.

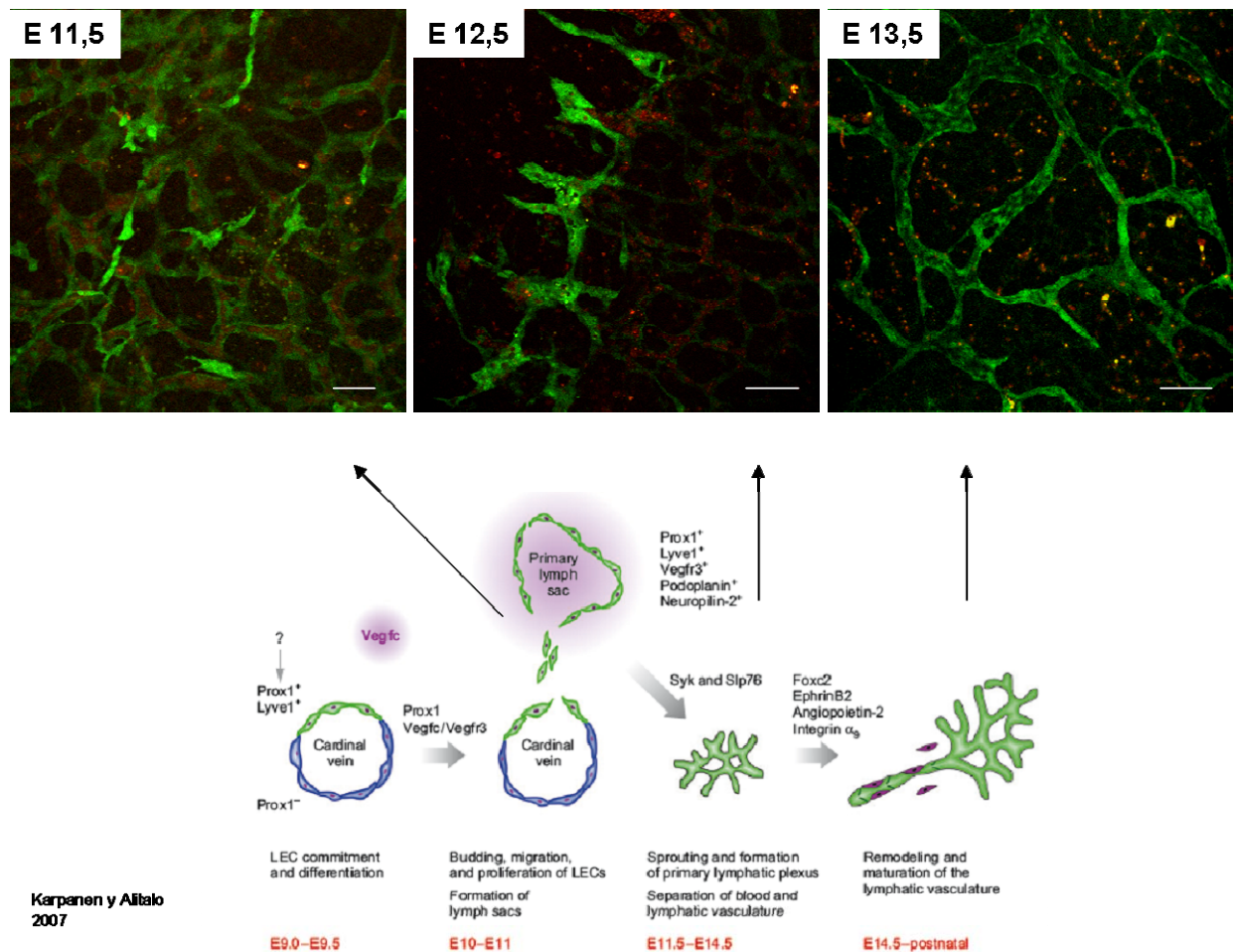
## 2.2 Detección de EGFP durante el desarrollo embrionario

La expresión de VEGFR3 en el embrión de ratón comienza a detectarse a partir del día E8.5 de desarrollo embrionario en el sistema vascular sanguíneo. En los días E10.5 y E11.5 empiezan a formarse los primeros sacos linfáticos que expresan también el receptor y ya a partir del día E13.5 la expresión de VEGFR-3 se hace específica de la vasculatura linfática, que ya se encuentra establecida, no detectándose su expresión en el endotelio de los vasos sanguíneos a partir de este estadio (Revisado en Karpanen and Alitalo 2007).

Con el fin de verificar que la expresión de la fusión IRES-EGFPluc introducida recapitula el patrón de expresión del receptor VEGFR3 en el modelo, se analizó en primer lugar la localización de la proteína EGFP por análisis de fluorescencia en embriones homocigotos para Flt4-EGFPluc a día E11.5, E12.5 y E13.5 de desarrollo mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP5) empleando para la excitación de la proteína fluorescente un láser de Argon de 488nm (Figura 10). A día E11.5 se detecta una emisión de fluorescencia específica (por encima del nivel de autofluorescencia del tejido) en los embriones en prácticamente toda la red vascular sanguínea. Entre la fluorescencia emitida por los vasos sanguíneos se detectan algunas estructuras o grupos celulares cuyo nivel de emisión de fluorescencia es superior y que debido a ese incremento en la emisión se identifican como aquellas que van a dar lugar al sistema linfático. A día E12.5 se observa cómo la emisión de fluorescencia procedente del sistema vascular sanguíneo va disminuyendo con respecto al estadio anterior, y se pueden detectar plexos que pudieran proceder de las estructuras que a día E11.5 presentaban unos niveles de fluorescencia superiores. A día E13.5 los niveles de fluorescencia del sistema vascular sanguíneo quedan reducidos a los niveles de

## Resultados

autofluorescencia normales para este tipo de vasos, mientras que la fluorescencia en los vasos linfáticos nos permite detectar una red completamente establecida (Figura 10).



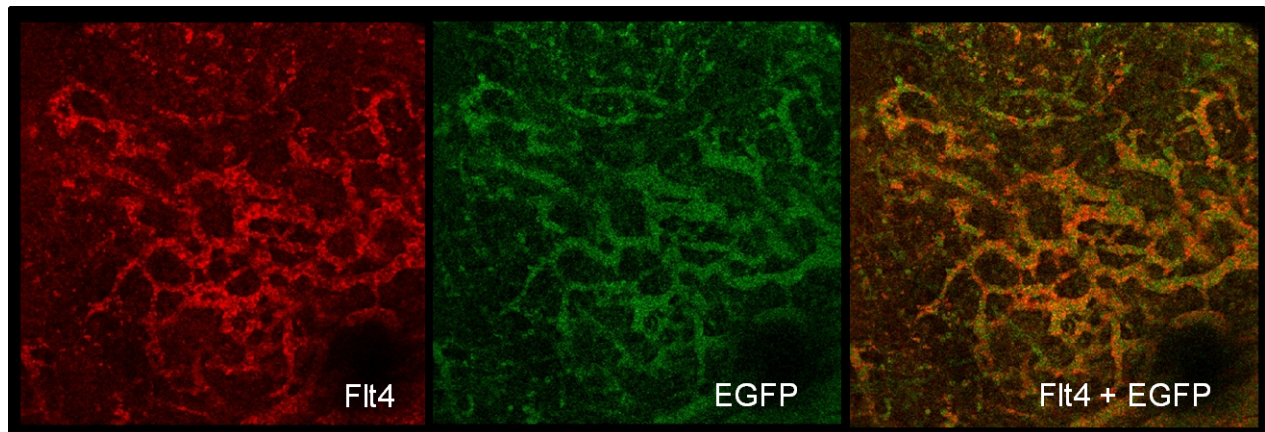
**Figura 10:** Análisis de la expresión de Flt4-EGFP luciferase en embriones KI/KI a diferentes estadios de desarrollo (E10.5, E11.5 y E13.5) mediante emisión de fluorescencia. Se observa cómo mediante fluorescencia es posible el seguimiento de la formación del sistema linfático, desde día E11.5 donde aparecen algunas estructuras que presentan fluorescencia, hasta el establecimiento de la red linfática a E13.5. Los datos obtenidos se correlacionan con el desarrollo del sistema linfático representado en el esquema inferior de la figura y que corresponde a una de las teorías existentes acerca del desarrollo del sistema linfático. (Adaptado de Karpanen and Alitalo 2007).

Para confirmar que efectivamente la fluorescencia detectada proviene de los vasos linfáticos, se realizó una inmunofluorescencia para VEGFR3 en embriones a E13.5, que es el momento en el que se obtuvo una mayor emisión de fluorescencia en el análisis anterior. Como se puede observar en la figura 11, existe un solapamiento prácticamente del 100% entre el patrón de expresión de VEGFR3 y el de la proteína de fusión EGFP luciferase, esto es, la proteína de fusión EGFP luciferase se expresa en el endotelio de los vasos linfáticos donde se expresa VEGFR3.

Estos resultados indican que la regulación de la expresión de la proteína EGFP en el modelo recapitula la regulación de la expresión del gen Flt4. Además, estos resultados demuestran que es posible la realización de un seguimiento del desarrollo embrionario del sistema linfático mediante la monitorización

directa de la expresión de VEGFR3 por emisión de fluorescencia de EGFP empleando el modelo Flt4-EGFPluc generado. Además nuestros resultados confirman que la expresión del receptor VEGFR3 queda restringida al endotelio de los vasos linfáticos a partir del día E13.5 tal y como se había descrito previamente utilizando técnicas de detección indirectas (Mäkinen et al 2001, Karpanen et al 2006)

En animales adultos no se ha conseguido detectar la fluorescencia emitida por la fusión EGFPluc por encima de los niveles de autofluorescencia del tejido, ni a nivel basal ni en procesos dónde se induce la expresión de VEGFR3.



**Figura 11:** Inmunofluorescencia en embriones homocigotos para EGFPluc a E13.5. Se representa en rojo la fluorescencia obtenida mediante inmunofluorescencia para Flt4. En verde la fluorescencia proveniente de la fusión EGFPluc del modelo generado. Las zonas en las que se produce una correspondencia entre ambos tipos de fluorescencia, se representan de color naranja poniendo de manifiesto que la proteína de fusión EGFPluc se encuentra allí dónde hay expresión para Flt4.

### 2.3 Análisis de la expresión de VEGFR3 en el desarrollo postnatal por detección de luminiscencia

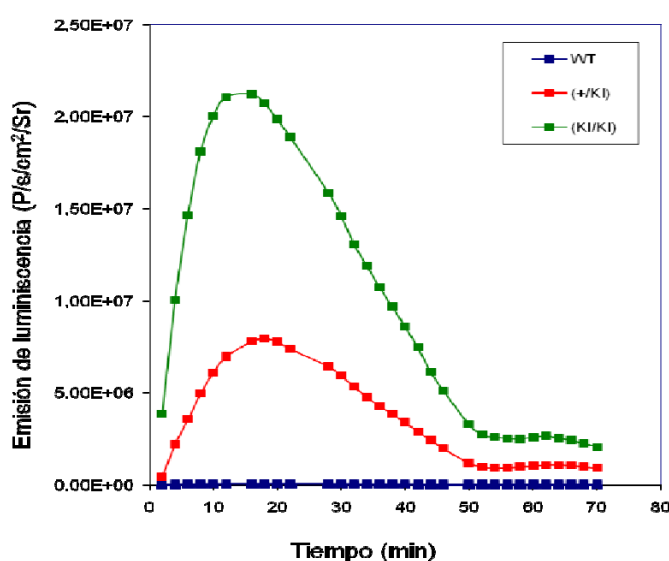
Como se ha descrito en el apartado 4.3 de la Introducción, VEGFR-3 es esencial durante el desarrollo embrionario ya que desempeña un papel importante en la maduración de los plexos vasculares antes de la generación del sistema linfático. Posteriormente es necesario para la supervivencia y mantenimiento de los vasos linfáticos durante el desarrollo embrionario y hasta un periodo postnatal aproximado de unas dos semanas (Mäkinen 2001, Karpanen, 2006). En el adulto la expresión de VEGFR3 permanece específica del endotelio linfático, pero disminuye hasta un nivel basal, aumentando su expresión sólo en procesos fisiopatológicos o procesos que cursen con inducción de linfangiogénesis (Revisado en Karpanen y Alitalo 2007). Con el fin de analizar y cuantificar el cambio en los niveles de expresión del receptor durante el desarrollo postnatal, y comprobar la funcionalidad de la luciferasa en el modelo, se realizó un análisis de emisión de luminiscencia desde la segunda semana de desarrollo hasta los 5 meses de edad en animales homocigotos y heterocigotos para el alelo Flt4-EGFPluc.



## Resultados

Previamente, y para poner a punto el método de medición de la actividad de luciferasa *in vivo*, se realizó un seguimiento de la emisión de luminiscencia tras la administración de luciferina (sustrato de la luciferasa) a animales de 5 semanas de edad de genotipo silvestre, homocigoto, o heterocigoto para la construcción Flt4-EGFP<sub>luc</sub>, con el fin de conocer la cinética y el máximo de emisión de luminiscencia en el modelo tras la inyección de luciferina, y posteriormente poder aplicar el mismo método de cuantificación a los distintos ensayos que se realicen. La luciferina se administró a una dosis de 150mg/Kg en suero salino de forma intraperitoneal y se cuantificó la emisión de luz del animal completo a intervalos de 2 minutos mediante un IVIS Spectrum (Xenogen) (Apartado 11 de Materiales y Métodos). Como se puede apreciar en la figura 12, tras la administración de luciferina, la emisión de luminiscencia va aumentando hasta los 20 minutos. A partir de ese punto, la emisión disminuye de forma rápida. Al cabo de 50 minutos ya no se detecta emisión de luminiscencia en el animal. Por tanto, el máximo de emisión de luz se detecta aproximadamente a los 20 minutos después de la inyección de luciferina en nuestro modelo. Sin embargo en todos los ensayos realizados, se hizo este mismo análisis cinético y se tomó como medida la emisión en el punto máximo.

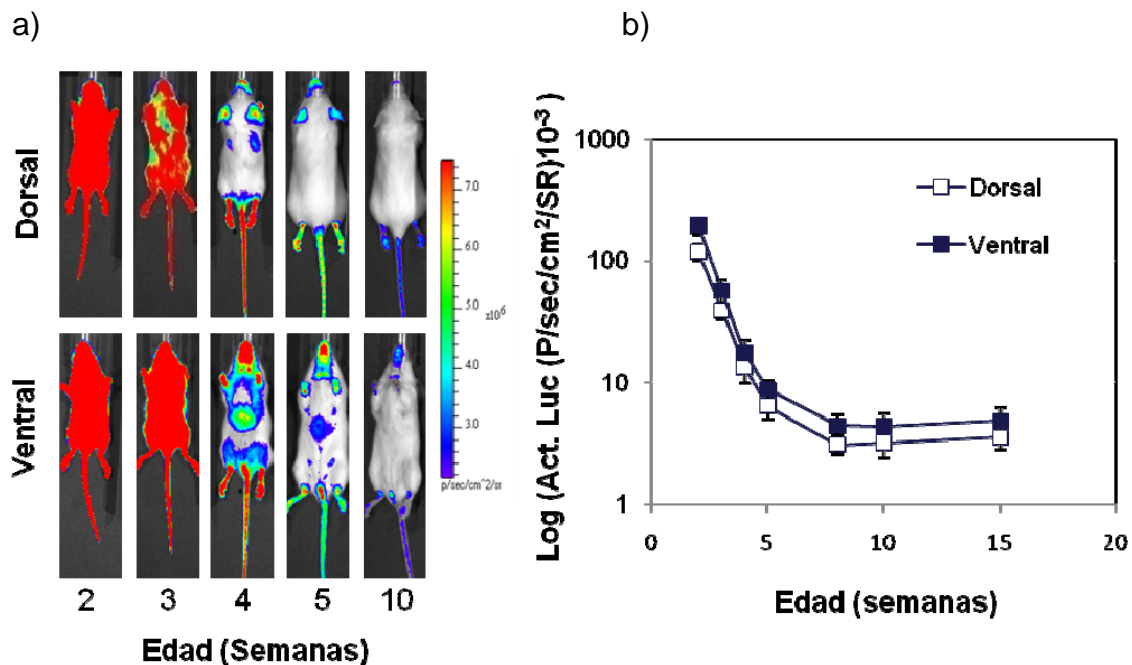
Como era de esperar, se observa también una relación prácticamente lineal entre el nivel de emisión de luz y la dosis génica del alelo Flt4-EGFP<sub>luc</sub>:  $0.75 \times 10^7$  y  $2.00 \times 10^7$  (p/seg/cm<sup>2</sup>/Sr) en animales heterocigotos y homocigotos respectivamente, lo que pone de manifiesto que el modelo puede ser utilizado para cuantificar niveles de expresión relativos de VEGFR3 *in vivo*.



**Figura 12:** Cinética de la actividad luciferasa tras la administración de luciferina en animales de 5 semanas de edad y de genotipo silvestre, homocigoto o heterocigoto para EGFP<sub>luc</sub>. Se obtiene un máximo de actividad a los 20 minutos tras la administración de luciferina. La cuantificación se realiza en la parte dorsal del animal.

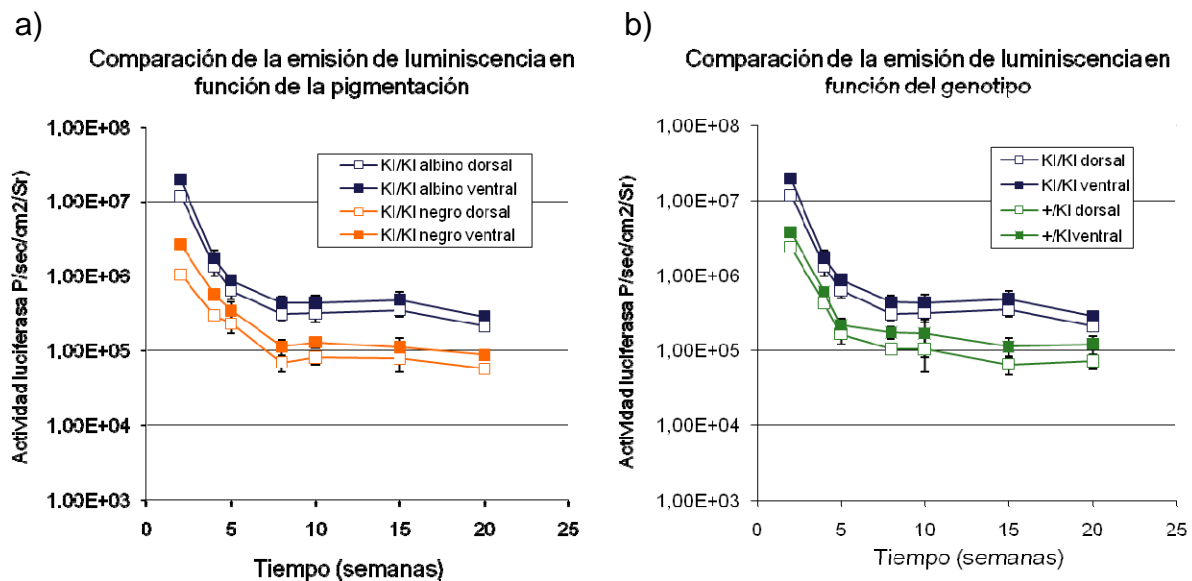
Una vez puesto a punto el método de medición, y para analizar el patrón de expresión del receptor VEGFR3 en el desarrollo postnatal, se midió la emisión de luminiscencia a distintas edades en un grupo de 5 hembras homocigotas para el alelo Flt4-EGFP<sub>luc</sub>, desde la segunda semana después del nacimiento y hasta los 5 meses de edad. Tal y como se representa en la figura 13, se observa una disminución de más de un orden de magnitud en la emisión, y por lo tanto en la expresión de VEGFR3 a partir de la segunda semana después del nacimiento y hasta la semana 8 de edad. A partir de la semana

10 de edad se produce una estabilización en la emisión que corresponde al nivel basal de expresión de VEGFR3. De acuerdo con este resultado, en ensayos de linfangiogénesis en animal adulto se emplearán animales de 10 o más semanas de edad, para evitar la interferencia de la disminución de la señal con el desarrollo del animal durante las 10 primeras semanas.



**Figura 13:** Monitorización de la expresión de VEGFR3 durante el desarrollo postnatal en el modelo reportero. a) Imágenes representativas de la emisión de luminiscencia ventral y dorsal en los distintos puntos del ensayo. b) Cuantificación de la emisión de luminiscencia del animal durante el transcurso del ensayo, se observa una estabilización de la señal a partir de la semana 10 de desarrollo del animal.

Por otro lado, con el objetivo de conocer mejor el comportamiento y las posibilidades del modelo y debido a que en la línea establecida, debido a su fondo genético, aparecían animales tanto albinos como pigmentados, se llevó a cabo una comparación en la emisión de luminiscencia en función de la edad entre animales de distinto color de pelaje y de genotipo homocigotos y heterocigotos para Flt4EGFP<sub>Luc</sub>. Como se ilustra en Figura 14a, la pigmentación oscura absorbe una gran parte de la emisión de luz, y para el mismo el genotipo, la emisión de luz en ratones pigmentados es un orden de magnitud inferior a la de los ratones albinos. Por este motivo se decidió establecer la línea en fondo albino, con el fin de aumentar la sensibilidad del método de medida en los diferentes ensayos favoreciendo la detección de pequeñas variaciones sobre los niveles de luminiscencia basales. La comparación de emisión entre animales homocigotos y heterocigotos de nuevo muestra que es posible diferenciar entre genotipos basándose en la emisión de luminiscencia, y que la emisión de luminiscencia en animales heterocigotos es suficiente para realizar ensayos con animales de éste genotipo (Figura14).



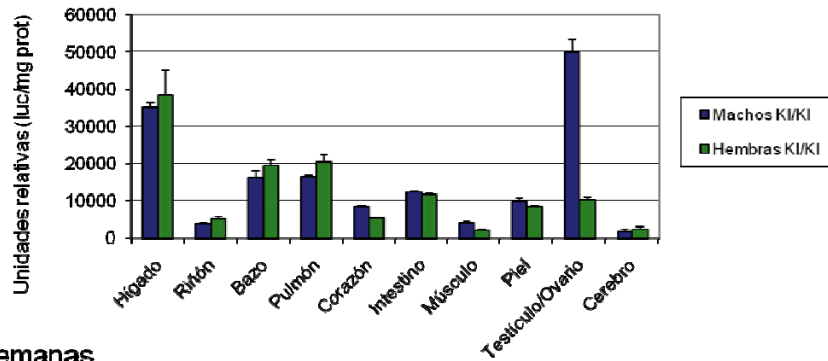
**Figura 14:** a) Comparación de la emisión de luminiscencia entre animales pigmentados y albinos durante el desarrollo postnatal. b) Comparación de la emisión de luminiscencia entre ratones albinos homocigotos y heterocigotos.

## 2.4 Expresión de luciferasa/VEGFR3 en diferentes tejidos

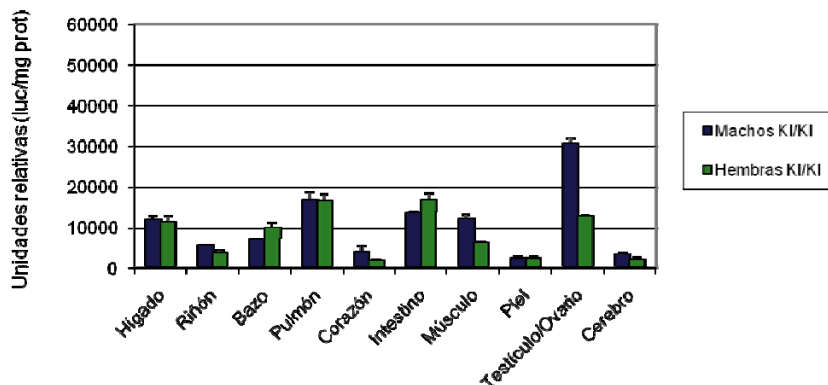
El modelo Flt4-EGFP<sub>luc</sub> permite la cuantificación de la expresión del receptor VEGFR3 mediante la detección de la actividad de la luciferasa tanto *in vivo* como *in vitro*. Con objeto de analizar la expresión relativa de VEGFR3 en distintos tejidos se llevó a cabo una medida de la actividad de la luciferasa *in vitro*, mediante la cuantificación de la emisión de luminiscencia en extractos procedentes de distintos tejidos del ratón y en distintos momentos del desarrollo postnatal (4 semanas y 14 semanas de edad). En paralelo se comparó la expresión de VEGFR3 entre machos y hembras del mismo genotipo para los mismos tejidos. Se observa que el nivel de emisión de luminiscencia es específico para cada tejido. Está descrito que los vasos linfáticos están presentes en todos los tejidos excepto en tejidos avasculares y en algunos órganos vascularizados como el cerebro, médula ósea y retina (Karpanen and Alitalo 2008). Como se representa en la Figura 15, los órganos que muestran una mayor actividad de luciferasa son hígado, bazo y órganos genitales, tanto en machos como en hembras. El cerebro es el órgano que menor actividad de luciferasa presenta, seguido de músculo, corazón (que tiene sólo vasos linfáticos superficiales) y riñón. No hay diferencias notables en los niveles de emisión entre las 4 y las 14 semanas de edad en algunos órganos como riñón, pulmón o intestino mientras que sí se observa una disminución notable en la actividad de luciferasa a las 14 semanas de edad en los órganos en los que hay mayor expresión que son hígado, bazo y órganos genitales.



## 4 semanas



## 14 semanas



**Figura 15:** Medida de la actividad de luciferasa en diferentes tejidos y en diferentes momentos de desarrollo del ratón. Asimismo se establece una comparación entre machos (n=3) y hembras (n=3). Se observa una disminución en la emisión de luminiscencia de la semana 4 a la 14, sobre todo en los órganos que presentan una mayor emisión: Hígado, bazo y órganos genitales.

Estos resultados son consistentes con lo observado en el ensayo descrito en el apartado 2.3 de los resultados, en el que se mide in vivo la emisión de luminiscencia en el animal completo. Los niveles de emisión son similares entre machos y hembras salvo en el caso de las gónadas, en que la señal es significativamente superior en testículos que en ovarios (Figura 15).

### 3. Aplicaciones del modelo Flt4-EGFP<sub>luc</sub>: seguimiento y cuantificación de linfangiogenesis en animal adulto.

Una de las aplicaciones más importantes de este modelo es la monitorización y cuantificación de procesos de linfangiogenesis in vivo mediante la utilización de técnicas de imagen no invasivas. La expresión de VEGFR3, que se mantiene en un nivel basal en los vasos linfáticos en el adulto, se induce en procesos de linfangiogenesis y esto debe traducirse en un aumento paralelo en la expresión de luciferasa y por tanto en un aumento en la señal de luminiscencia que se puede detectar y cuantificar in vivo.

Con el fin de verificar la utilidad de nuestro modelo como reportero de linfangiogenesis en procesos fisiológicos se realizaron diversos ensayos que resultan en la inducción de inflamación o de desarrollo tumoral en animales portadores del alelo Flt4-EGFP<sub>luc</sub> y se monitorizó la emisión de luminiscencia asociada a estos procesos.

### 3.1 Linfangiogenesis e inflamación

Existen numerosas evidencias de la relación existente entre los procesos de linfangiogenesis e inflamación (Kerjaschki 2005, Maruyama 2005, Zhang 2007). De hecho, es difícil inducir un proceso de linfangiogenesis in vivo sin inducir un proceso inflamatorio previo. Entre las distintas células que son reclutadas al sitio de la inflamación, algunas subpoblaciones de macrófagos presentan expresión de VEGFR3 y son capaces de transdiferenciarse para formar vasos linfáticos (Maruyama et al 2005, Kerjaschki 2005).

Teniendo en cuenta esto, se describe a continuación una serie de ensayos que cursan con inducción de inflamación para, en primer lugar, comprobar si el modelo permite el seguimiento y cuantificación in vivo de procesos de generación de nuevos vasos linfáticos, y en segundo lugar establecer la relación que existe entre estos procesos y el proceso inflamatorio.

#### 3.1.1 Ensayo de cicatrización de heridas

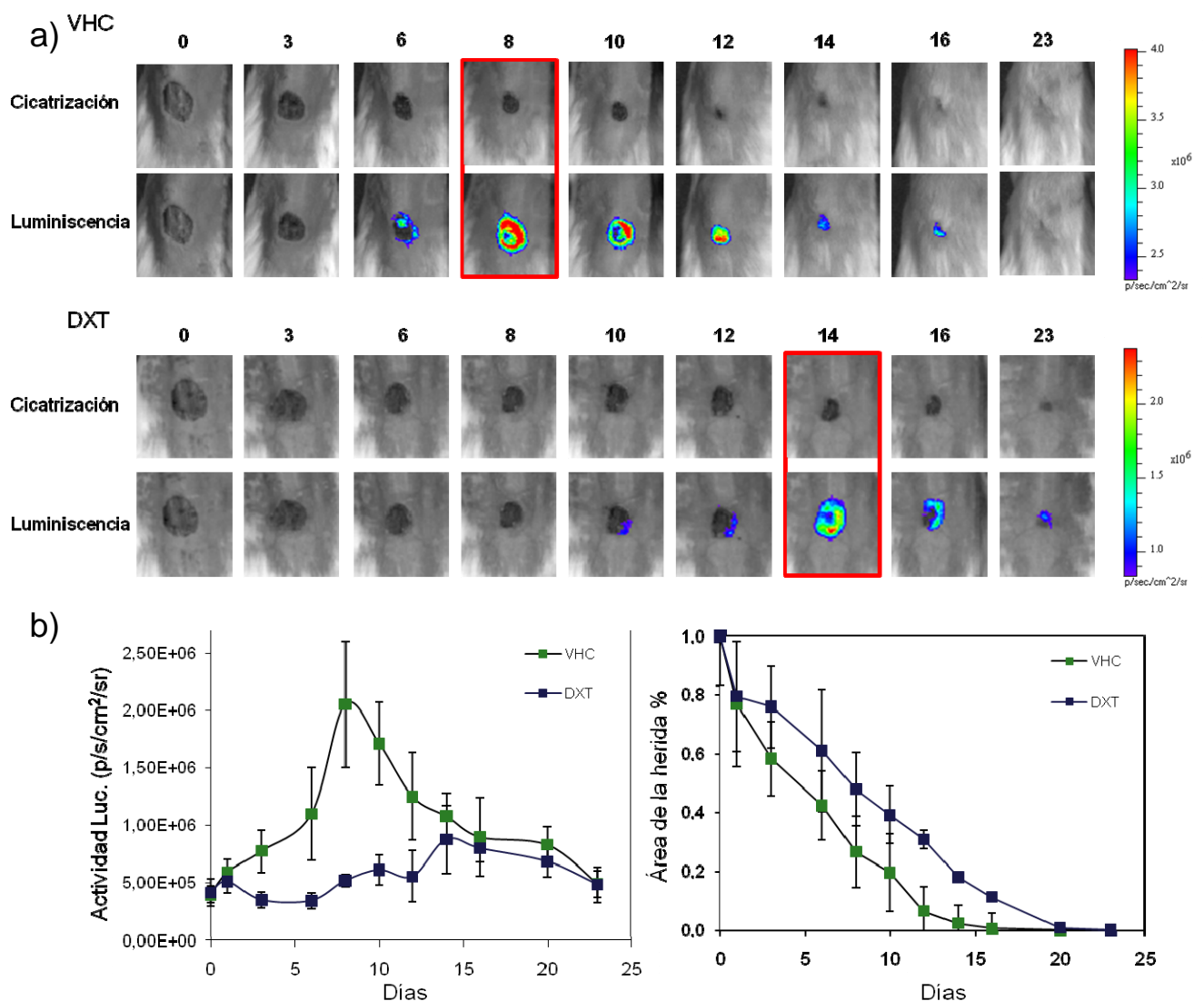
La cicatrización de heridas es un proceso complejo que comprende la participación e interacción de diversos tipos celulares. Se ha descrito y caracterizado la generación de nuevos vasos y capilares sanguíneos durante los procesos de cicatrización, así como el reclutamiento de células inflamatorias circulantes como monocitos y neutrófilos al área de la herida en respuesta, entre otros factores, a la activación de las células endoteliales (Martin 1997). Además, se ha demostrado que durante los procesos de cicatrización de heridas cutáneas no sólo se produce un incremento de vasos sanguíneos, sino que también se producen procesos de generación de nuevos vasos linfáticos en la zona próxima al área de cicatrización (Paavonen et al. 2000, Ji et al. 2004).

Para comprobar si nuestro modelo permite detectar y cuantificar estos procesos, a un grupo de hembras heterocigotas para la mutación Flt4-EGFP<sup>luc</sup>, de 11-14 semanas de edad, se les realizó una herida cutánea de 8mm de diámetro en el lomo y se hizo un seguimiento del proceso de cicatrización mediante la medida de la emisión de luminiscencia procedente del área de la herida. Como nivel de luminiscencia basal se tomó la señal de emisión de la piel del animal en un área próxima a la herida y del mismo tamaño que la herida realizada (Figura 16a). Se observó una inducción de la señal bioluminiscente desde el primer día de cicatrización y con máximo de emisión en el octavo día después de practicarse la herida, que corresponde a una inducción de 5 veces respecto a la señal basal de luminiscencia procedente de la piel. En este momento, el tamaño de la herida es aproximadamente un 30% del tamaño original, es decir, el máximo de emisión se detecta cuando la cicatrización es de un 70%. A partir del día 8 la señal disminuye y retorna al nivel basal de emisión en torno al día 24 que corresponde a la completa cicatrización de la herida (Figura 16b).

El aumento de luminiscencia que se detecta a lo largo del proceso de cicatrización puede reflejar un aumento en los niveles de VEGFR3 debido a dos procesos, el reclutamiento de macrófagos positivos para VEGFR3 debido al proceso inflamatorio y la formación de nuevos vasos linfáticos (linfangiogenesis).

Con el fin de comprobar qué parte de la señal detectada corresponde al proceso inflamatorio con reclutamiento de macrófagos VEGFR3<sup>+</sup> y qué parte corresponde al proceso de generación de nuevos

vasos linfáticos, se realizó el mismo ensayo en un grupo de animales tratados diariamente con el agente antiinflamatorio Dexametasona (DXT). Uno de los mecanismos de acción de éste fármaco es la inhibición de la movilización de macrófagos. La inducción de luminiscencia en el grupo de animales tratados con DXT durante el proceso de cicatrización es unas dos veces menor que la inducción en el grupo de animales no tratados. Esta diferencia estaría asociada fundamentalmente a una inhibición del reclutamiento de macrófagos por parte de la DXT. Además, el máximo de emisión de luz se encuentra retrasado con respecto al grupo anterior, del día 8 sin DXT al día 14 con DXT y el pico de emisión es menos pronunciado, extendiéndose durante más días. También se observa un alargamiento en el tiempo de cicatrización para el grupo de animales tratados con DXT de unos 3-4 días (Figura 16a y b), lo que parece indicar que la movilización de macrófagos contribuye a mejorar el proceso de cicatrización.

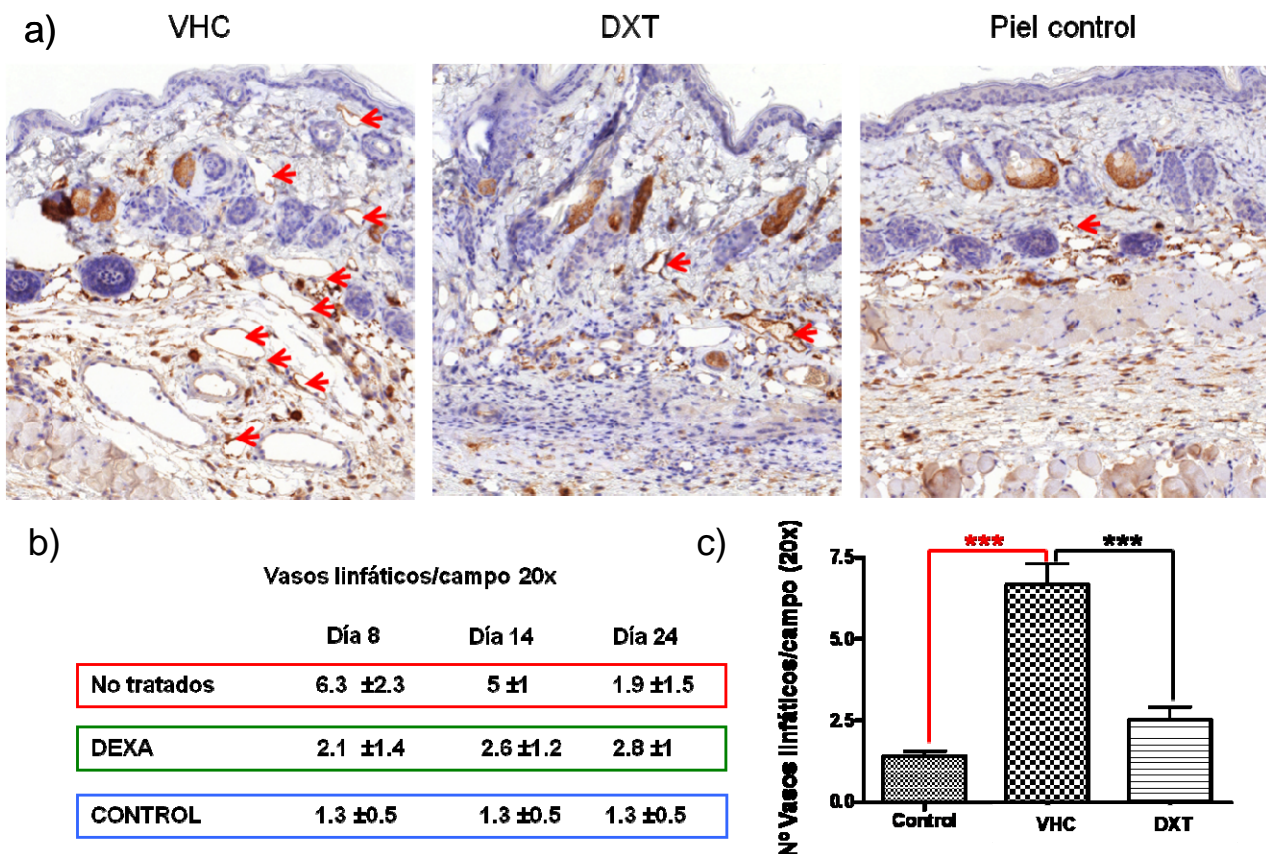


**Figura 16.** Análisis de la expresión de VEGFR3 en el modelo reportero en ensayos de cicatrización cutánea. a) Imágenes representativas de la emisión de luciferasa durante un ensayo de cicatrización cutánea con o sin administración de dexametasona (DXT). b) Cuantificación de la emisión de luciferasa en el área de la herida (b.1) y cuantificación del proceso de cicatrización (b.2) durante el ensayo. Los datos se muestran como media  $\pm$  SD.

Se realizó en paralelo un análisis histopatológico de los bordes de la herida para cuantificar la densidad de vasos linfáticos y observar el proceso inflamatorio en distintos momentos del ensayo. El

## Resultados

recuento de vasos linfáticos en la zona de la herida a día 8 del ensayo muestra que existe un proceso de linfangiogénesis en el grupo de animales no tratados con DXT: Se contaron  $6.3 \pm 2.3$  vasos linfáticos/campo utilizando un objetivo 20x, mientras que en la piel de animales a los que no se les realizó una herida el conteo fue de  $1.3 \pm 0.5$  vasos linfáticos/campo. Sin embargo, en los animales con herida tratados con DXT, el número de vasos linfáticos fue de  $2.1 \pm 1.4$  vasos linfáticos/campo, 3 veces menos que en el grupo de animales no tratados con antiinflamatorio (Figura 17a y b). En los cortes histológicos se observa que la inflamación persiste en la herida durante aproximadamente las dos primeras semanas en animales no tratados. En conjunto, los resultados de este ensayo indican que en la cicatrización de heridas, el modelo Flt4-EGFP<sup>+</sup> detecta tanto la fase inflamatoria con reclutamiento de macrófagos VEGFR3<sup>+</sup>, como el proceso de linfangiogénesis asociado a la cicatrización. Demuestran además que la movilización de macrófagos, que tiene lugar durante la fase inflamatoria de la cicatrización, contribuye en gran medida a generar nuevos vasos linfáticos. Así, cuando se bloquea el reclutamiento de macrófagos, disminuye la linfangiogénesis y la cicatrización se halla comprometida alargándose el tiempo que tarda en cerrarse la herida.



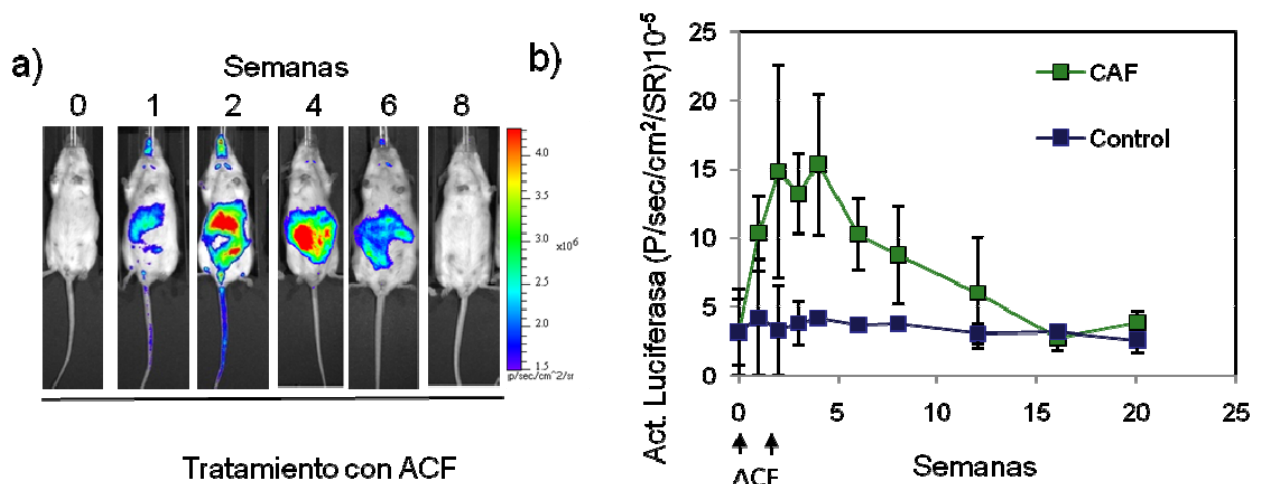
**Figura 17.** a) Análisis histopatológico a día 8 del ensayo. Se muestra un incremento de vasos linfáticos (señalados con flechas rojas) en la zona de la herida de los animales tratados únicamente con vehículo en comparación con el grupo que recibió DXT y el grupo control. b) y c) Recuento de vasos linfáticos/campo (20x) en ensayos de cicatrización cutánea para los diversos grupos del ensayo. Se analizaron las histologías de 3 animales para cada grupo y para cada punto. Se muestra el recuento de vasos linfáticos para los días 8, 14 y 24 y para los diversos grupos que forman parte del ensayo. El análisis estadístico indica que la diferencia entre los diversos grupos es significativa. Análisis Anova: Valor P: VHC vs DEXA  $P = 0.00098$  (\*\*\*) ; VHC vs Control  $P = 0.00095$  (\*\*\*) .

Teniendo en cuenta los resultados se puede afirmar que el modelo permite el seguimiento *in vivo* de procesos de generación de nuevos vasos linfáticos, así como de procesos inflamatorios asociados en este tipo de ensayos.

### 3.1.2 Inflamación inducida por administración intraperitoneal de Adyuvante Completo de Freund

Continuando con la caracterización del modelo Flt4-EGFP<sub>Luc</sub> como herramienta genética para monitorizar *in vivo* los procesos de linfangiogenesis e inflamación, se indujo a un grupo de animales un proceso inflamatorio por inyección intraperitoneal de Adyuvante Completo de Freund (ACF) siguiendo el protocolo descrito en Mancardi et al 1999. El ACF contiene *Mycobacterium tuberculosis* inactivado, que origina una reacción inflamatoria en el sitio de inyección e hiperplasia y cambios estructurales en los ganglios linfáticos locales, además de originar la aparición de granulomas locales, o alejados del sitio de inyección, compuestos sobre todo por fagocitos mononucleados (Billiau et al. 2001).

En este ensayo se trató un grupo de 8 hembras de 16-18 semanas de edad y heterocigotas para Flt4-EGFP<sub>Luc</sub> con dos inyecciones intraperitoneales de 200µl de ACF espaciadas por un intervalo de 15 días. A los animales del grupo control se les inyectó únicamente PBS (Apartado 14 de Materiales y Métodos). Como en los ensayos anteriores, el seguimiento del proceso se llevó a cabo por medida de emisión de luminiscencia en la zona de inflamación, que en éste caso es el abdomen del animal (Figura 18a). Los animales tratados con ACF presentan un incremento de emisión durante el primer mes desde el inicio del tratamiento de hasta 5 veces el nivel de emisión basal. A partir de ese momento, la luminiscencia va disminuyendo hasta niveles basales (Figura 18b).

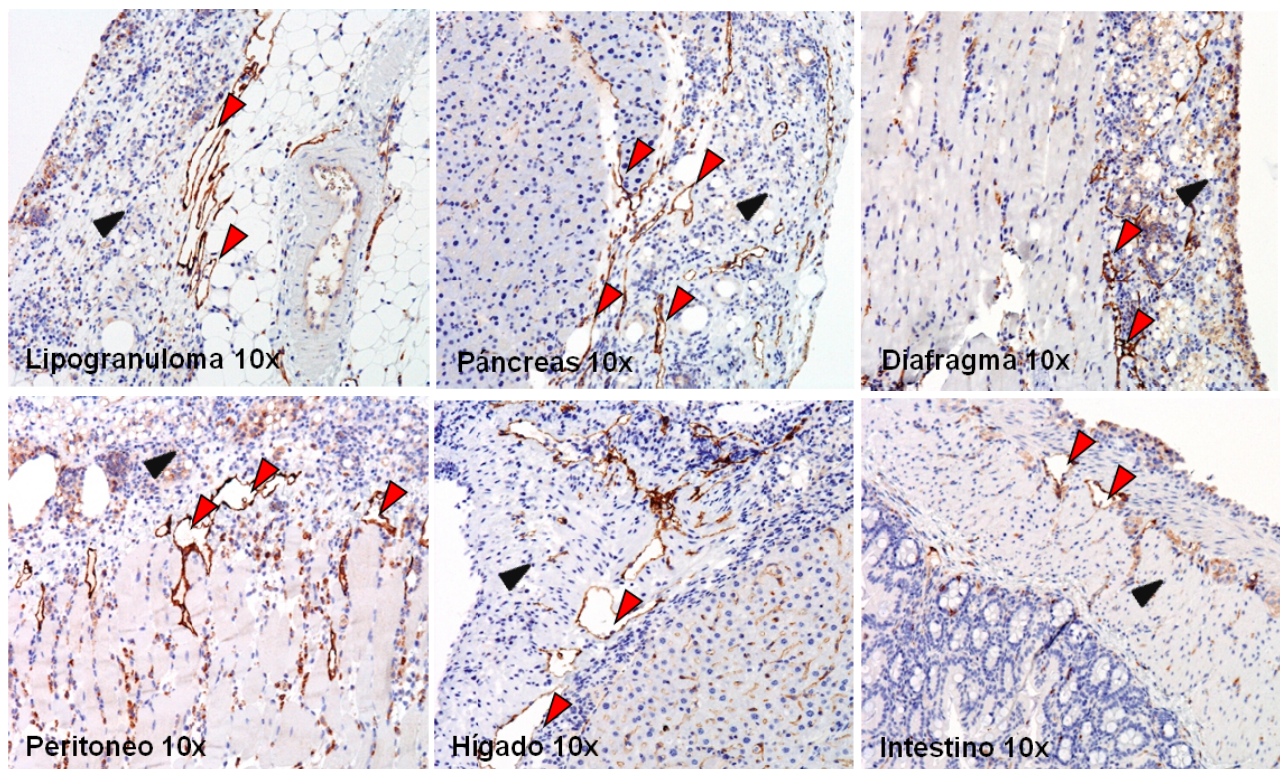


**Figura 18:** a) Imágenes representativas de la emisión de luminiscencia en un animal tratado con ACF. Se observa que el máximo de emisión se sitúa entre la semana 2 y 4 desde el comienzo del ensayo. b) Cuantificación de la actividad de la luciferasa en el grupo de animales tratado con ACF y en el grupo tratado con PBS. Los datos se representan como media  $\pm$  SD.

En el momento en que los niveles de emisión presentan sus valores más altos, aproximadamente en la semana 4 del ensayo, se realizó un análisis histopatológico de diferentes órganos de la cavidad



abdominal de los animales tratados para analizar la presencia de células inflamatorias y la densidad de vasos linfáticos en los órganos afectados por el tratamiento. Se realizó una inmunohistoquímica con anticuerpos anti-VEGFR3 para visualizar específicamente los vasos linfáticos y las posibles células inflamatorias positivas para VEGFR3. Dicho análisis reveló un infiltrado inflamatorio que rodea todos los órganos de la cavidad peritoneal de los animales tratados con ACF. En todos los órganos, entre la parte sana y el tejido inflamatorio que lo rodea, se observa un incremento no sólo en el número de vasos linfáticos, sino también en el calibre de los mismos (Figura 19). Por otro lado, en este ensayo la mayoría de las células presentes en el infiltrado inflamatorio son negativas para VEGFR3. Por tanto en este ensayo la señal de luminiscencia que se detecta en el modelo refleja fundamentalmente la formación de nuevos vasos linfáticos asociada a la inflamación inducida por la inyección de ACF.



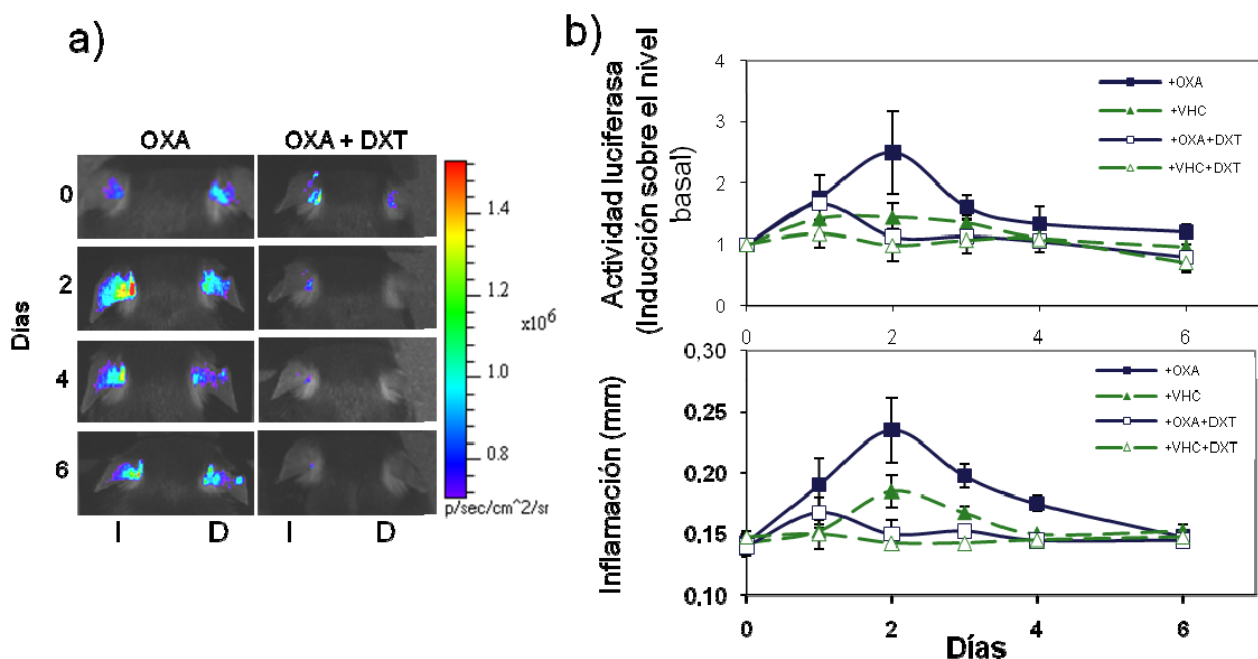
**Figura 19:** Inmunohistoquímica frente a VEGFR3 en un proceso inflamatorio tras el tratamiento con ACF, se observa la densidad y el calibre de los vasos linfáticos en diferentes tejidos de la cavidad abdominal (flechas rojas) situados entre el tejido sano y un infiltrado inflamatorio que se encuentra rodeando todos los órganos (flechas negras).

### 3.1.3 Ensayo de Hipersensibilidad por contacto. Inducción de inflamación por Oxazolona

La administración tópica de oxazolona induce un proceso de hipersensibilidad que transcurre en dos fases. La primera fase o fase de sensibilización se produce por la aplicación cutánea del agente químico y resulta en la activación y proliferación de linfocitos. La segunda fase, tras una segunda aplicación del mismo agente químico a un individuo pre-sensibilizado, produce una reacción inflamatoria local con infiltración de linfocitos T, neutrófilos y macrófagos (Zhang et al. 2004).

Para analizar la cinética de inducción de expresión de VEGFR3 y la contribución de la linfangiogénesis en este tipo de proceso inflamatorio un grupo de 5 hembras pigmentadas de 11 semanas de edad, homocigotas para la mutación Flt4-EGFP<sub>Luc</sub>, se pre-sensibilizaron por aplicación de Oxazolona (OXA) 2% en el abdomen. Después de 6 días a las mismas hembras se les administró en la oreja derecha OXA 1% en una única dosis. Como control negativo se utilizó la oreja izquierda de cada ratón tratada únicamente con vehículo (Acetona/aceite 4:1). Un segundo grupo de hembras del mismo genotipo (n=7) se trató siguiendo el mismo protocolo y recibió además un tratamiento de DXT diario. (El protocolo se describe en el Apartado 15 de Materiales y Métodos).

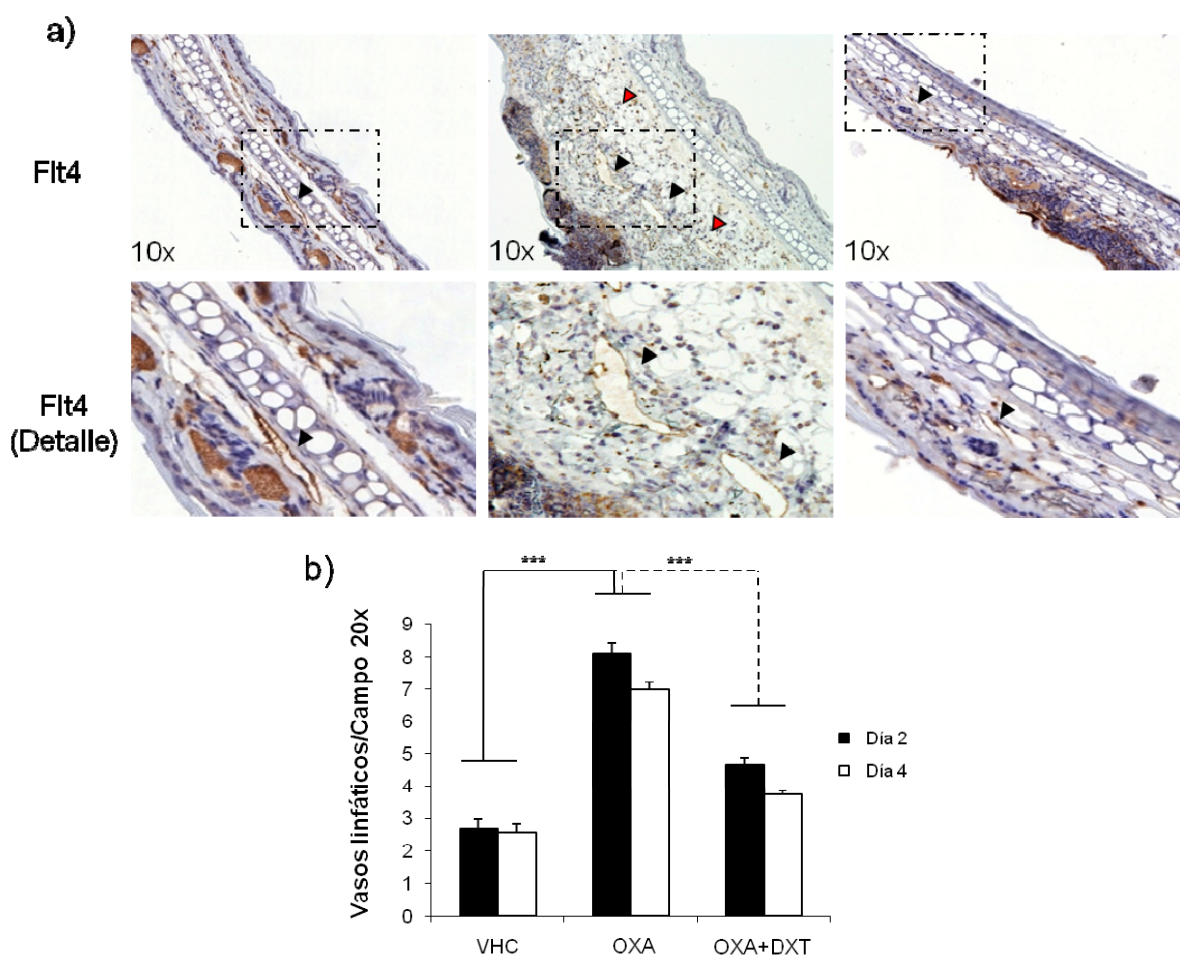
El seguimiento del proceso se lleva a cabo por medida de emisión de luminiscencia en el área de inflamación, es decir en la oreja tratada con OXA y en la tratada sólo con vehículo como control (Figura 20a). Se observa que en el grupo de animales tratado sólo con OXA existe un incremento en la emisión de luminiscencia en la oreja tratada de hasta 2.5 veces, con respecto al nivel de emisión basal, 2 días después del tratamiento. A partir de este punto se produce una disminución en la emisión de forma que, a día 4 después del tratamiento, los niveles de emisión coinciden con los niveles basales. En el grupo tratado con DXT no se detecta este pico de emisión a día 2 después del tratamiento (Figura 20b, panel superior). Además se observa una reducción en la respuesta inflamatoria, medida por la anchura de la oreja (Figura 20b, panel inferior) en presencia de DXT, como era predecible por la actividad anti-inflamatoria de la DXT.



**Figura 20:** Inflamación inducida por administración tópica de oxazolona: a) Emisión de luminiscencia en el grupo de ratones tratados con oxazolona (OXA) y con oxazolona más dexametasona (OXA + DXT) en los distintos días del ensayo. Se muestran la oreja tratada (I) y la oreja control (D) para cada día del ensayo y para cada grupo de tratamiento. b) Superior: Cuantificación de la emisión de luminiscencia en los animales de los distintos grupos del ensayo. Los datos se representan como niveles de inducción sobre el nivel basal. Se observa el efecto de la administración de dexametasona en la emisión de luminiscencia. Inferior: Medida del proceso inflamatorio en los distintos puntos del ensayo. Los datos se representan como media  $\pm$  SD.

## Resultados

Para verificar que la inducción en la emisión de luminiscencia refleja la formación de nuevos vasos linfáticos en este ensayo se hicieron cortes histológicos de las orejas de animales de ambos grupos OXA y OXA+DXT sacrificados en los días 2 y 4 después tratamiento. Los vasos linfáticos se tiñeron con anticuerpo anti-VEGFR3. Tal y como se muestra en la Figura 21a y b, a día 2 de tratamiento se observa un aumento en la densidad de vasos linfáticos en el grupo tratado sólo con OXA ( $8 \pm 1.5$  vasos linfáticos/campo 20X), en comparación con el control ( $2.3 \pm 0.8$  vasos linfáticos/campo 20X). Esto supone un incremento de unas 3 veces en el número de vasos linfáticos en respuesta a la OXA. Este aumento en el número de vasos se mantiene a día 4 a pesar de la disminución en los niveles de emisión de luminiscencia. Esto se puede explicar por la maduración y establecimiento de los vasos linfáticos de nueva formación que conlleva una disminución en la expresión del receptor VEGFR3. El grupo de animales tratados con DXT presenta un incremento en la densidad de vasos linfáticos menor que en los animales no tratados con DXT ( $4.5 \pm 0.8$  vasos linfáticos/campo 20X) a pesar de que el tejido no muestra signos evidentes de inflamación (Figura 21.b).



**Figura 21:** a) Análisis inmunohistoquímico frente a VEGFR3 a día 2 del ensayo para los animales tratados con OXA, con VHC o con OXA+DXT. La oreja tratada con OXA presenta un mayor engrosamiento como consecuencia del infiltrado inflamatorio y edema que se produce (flechas rojas). Se observa también la presencia de vasos linfáticos dilatados como consecuencia del tratamiento con OXA (flechas negras) en comparación con la oreja tratada sólo con vehículo. EL tratamiento con OXA + DXT disminuye la inflamación y el edema, así como la presencia de vasos linfáticos dilatados. b) Cuantificación de la densidad de vasos linfáticos (número de vasos linfáticos /campo 20x) en el lugar de la inflamación a día 2 y 4 del ensayo. El resultado se muestra como media  $\pm$  SD. Análisis Anova: Valor P: VHC vs OXA  $P=0.00087$  (\*\*\*); OXA vs. OXA+DXT  $P=0.00094$  (\*\*\*).



Por tanto, y como ocurre en el ensayo de cicatrización, los ratones tratados con el agente antiinflamatorio presentan menor número de vasos linfáticos de nueva formación en el área inflamada, poniéndose así de manifiesto la estrecha relación existente entre inflamación y linfangiogénesis y la capacidad del modelo para monitorizar estos procesos.

### 3.1.4. Detección de precursores endoteliales

La contribución de células progenitoras endoteliales circulantes o de otros tipos de células progenitoras a la formación de nuevos vasos linfáticos en procesos de linfangiogénesis en adulto es un tema de gran relevancia y que en la actualidad es objeto de controversia. Grupos como el del Dr. Kari Alitalo mantienen que los nuevos vasos linfáticos que se forman en procesos patológicos lo hacen exclusivamente a partir de vasos preexistentes en la zona (He et al. 2004, Purhonen et al. 2008). Sin embargo, otros grupos mantienen que las células progenitoras circulantes son capaces de diferenciarse a células endoteliales linfáticas, aunque la naturaleza de éstas células así como su contribución al proceso de linfangiogénesis no están bien caracterizados (Religa et al, 2005, Kerjaschki 2006). También se ha descrito que durante la gestación células progenitoras del feto, pasan a la madre y, en procesos de angiogénesis, se incorporan a los vasos sanguíneos de nueva formación, pudiendo llegar a formar parte de la vasculatura de la madre (Nguyen et al. 2007; Kerjaschki et al. 2006). Pero esto no se ha mostrado nunca en vasos linfáticos.

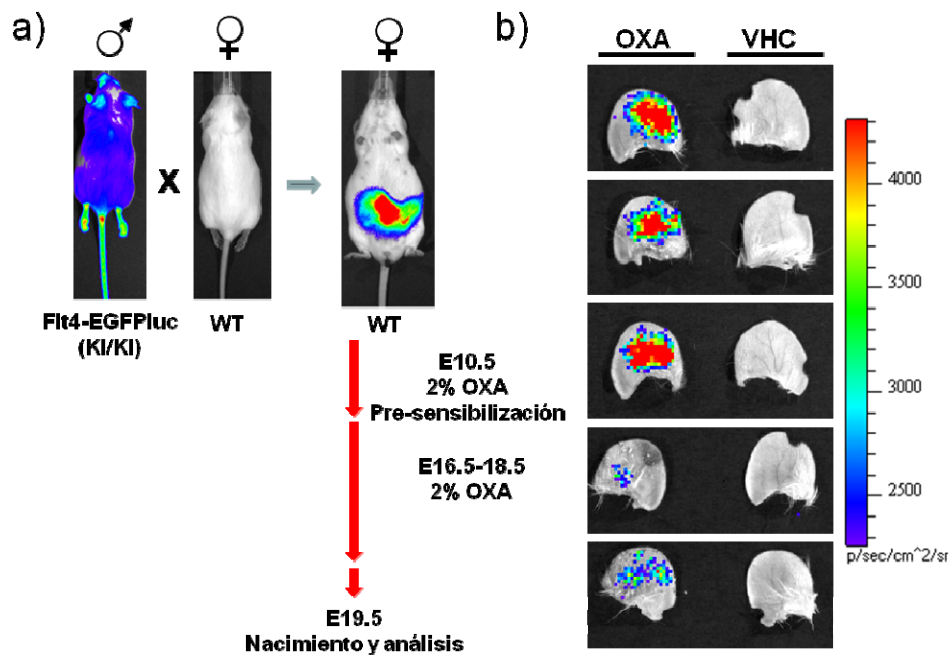
Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos estudiar in vivo la contribución de células progenitoras fetales a un proceso de linfangiogénesis utilizando para ello el modelo Flt4-EGFP<sub>luc</sub>. Para este estudio se cruzaron hembras de genotipo silvestre con machos homocigotos para la construcción Flt4-EGFP<sub>luc</sub>. De esta manera toda la descendencia será portadora de la construcción Flt4-EGFP<sub>luc</sub> en heterocigosis. En este sistema, siendo la madre de genotipo silvestre, cualquier señal de bioluminiscencia detectada en los tejidos maternos la estarían emitiendo células procedentes de los fetos en gestación.

Tras verificar el estado gestante de la madre mediante detección de la luminiscencia procedente de los embriones a día E10.5 de gestación (Figura 22), se llevó a cabo el ensayo de hipersensibilidad por contacto en las orejas de la madre mediante administración tópica de OXA 2%, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos, apartado 16. De cada una de las hembras que formaban parte del grupo de ensayo (n=5) se trató la oreja izquierda con oxazolona y la derecha con vehículo.

A día E19.5, después del parto, se procedió al análisis de las orejas de la madre por detección de luminiscencia. En la Figura 22 se observa que todas las orejas a las que se administró OXA y ninguna de las que se les administró sólo vehículo en las mismas hembras, presentan una señal de luminiscencia fácilmente detectable in vivo. Este resultado pone de manifiesto que efectivamente células precursoras fetales pueden movilizarse a través de la placenta y pasar a la circulación materna pudiendo ser reclutadas a sitios donde se produce un daño tisular, como lo es un proceso inflamatorio. Asimismo este resultado valida el ratón Flt4-EGFP<sub>luc</sub> como un modelo que posibilita el seguimiento in vivo de los precursores movilizados y de su localización en tejidos maternos.

## Resultados

Debido a los reducidos niveles de expresión de EGFP en nuestro modelo y a la ausencia de anticuerpos anti-EGFP o anti-luciferasa que funcionen adecuadamente en histología (tanto en cortes de parafina como en congelación), en este ensayo no pudimos determinar si las células progenitoras fetales que se han reclutado efectivamente llegan a formar parte de nuevos vasos linfáticos o sólo forman parte del infiltrado inflamatorio presente en la zona tratada. Sin embargo, un experimento muy similar realizado con el modelo Flt4-CreERT<sup>2</sup> descrito en la segunda parte de Resultados, demuestra que los precursores movilizados sí se incorporan al endotelio de los vasos linfáticos de la madre (Ver apartado 6.1 de resultados).



**Figura 22:** Detección de precursores endoteliales mediante emisión de luminiscencia. a) Esquema del ensayo y tratamiento con Oxazolona. b) Análisis de la emisión de luminiscencia en las orejas tratadas con OXA y con vehículo de los animales que constituyan el grupo de tratamiento. Sólo las orejas que han sido tratadas con OXA presentan emisión de luminiscencia.

### 3.2 Linfangiogénesis tumoral

Uno de los principales objetivos que nos planteamos con la generación del modelo Flt4-EGFP<sup>luc</sup> es el seguimiento y cuantificación in vivo de procesos de linfangiogénesis tumoral para estudiar su relación con la capacidad metastática de los tumores y para disponer de un modelo experimental donde poder ensayar el efecto de inhibidores de este proceso in vivo tanto a nivel genético como a nivel farmacológico. Existe un amplio debate sobre la implicación y la relevancia de la linfangiogénesis en la diseminación tumoral y en los procesos de metástasis. El sistema linfático es una de las principales vías de diseminación de las células tumorales a sitios distantes del tumor, y la metástasis en ganglios linfáticos proximales es indicador de la agresividad tumoral y de mal pronóstico (revisado en Staker et al. 2002). Además, hay estudios que demuestran que los tumores pueden inducir la formación de vasos linfáticos, y que la linfangiogénesis tumoral se correlaciona con la metástasis a nódulos linfáticos en modelos experimentales de cáncer y en algunos cánceres humanos (revisado en Wissmann and Detmar

2006, Shayan et al. 2006). Sin embargo otros estudios indican que no es necesaria la formación de nuevos vasos linfáticos para la diseminación tumoral y la formación de metástasis en nódulos linfáticos. Además se ha descrito que algunos tumores primarios inducen una respuesta linfoangiogénica distante, a nivel de ganglios linfáticos que contribuye a la diseminación de las células tumorales y la formación de metástasis (revisado en el apartado 7 de Introducción).

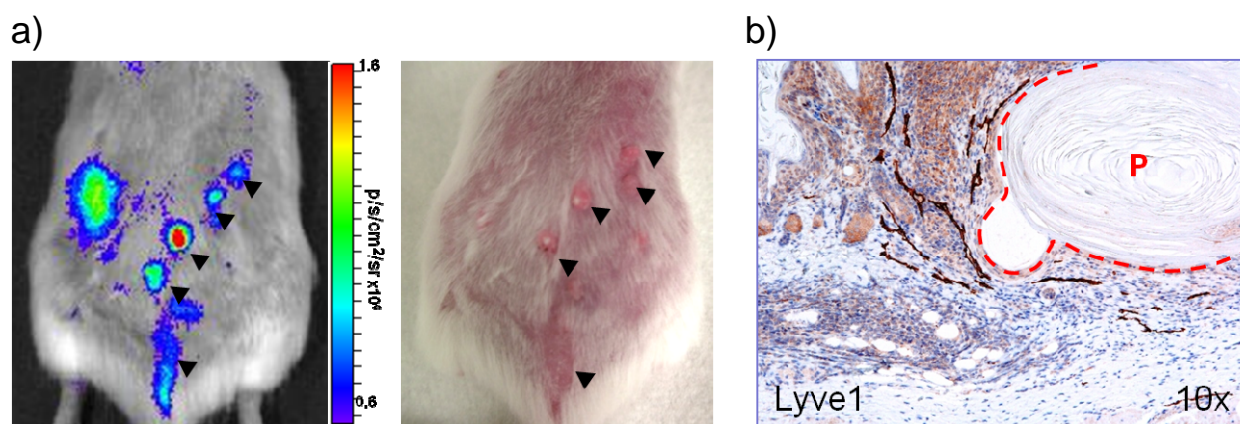
Para la validación del modelo Flt4-EGFPluc como herramienta para el seguimiento de la linfangiogénesis tumoral mediante técnicas de imagen no invasivas se llevaron a cabo diversos ensayos de xenografts con líneas tumorales de distinto origen, tanto humano como de ratón, y con diferente potencial metastático así como ensayos de carcinogénesis química que se describen a continuación.

### 3.2.1 Carcinogénesis química

Para comenzar con la caracterización del modelo Flt4-EGFPluc como reportero de linfangiogénesis tumoral se llevaron a cabo ensayos de carcinogénesis química mediante tratamiento tópico con DMBA/TPA en la piel de animales Flt4-EGFPluc con el fin de analizar si el modelo permitía la detección temprana, mediante medida de luminiscencia de procesos inflamatorios/linfangiogénicos inducidos por este protocolo de carcinogénesis.

El tratamiento se realizó sobre un grupo de animales homocigotos para Flt4-EGFPluc de 5 días de edad siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos (Apartado 19) y se realizó una medida de la emisión de luminiscencia quincenal de cada uno de los animales, así como la observación de la aparición de papilomas. Se obtuvo emisión de luminiscencia desde los primeros momentos de aparición de los papilomas, señal que fue en aumento según el crecimiento del papiloma. Tal y como se muestra en la Figura 23, la emisión de luminiscencia permite diferenciar la zona de crecimiento de cada papiloma por encima del nivel basal de emisión del animal.

El análisis inmunohistoquímico de los papilomas con anticuerpos frente a Lyve1 revela que existe un proceso de formación de nuevos vasos linfáticos en toda la zona que rodea al papiloma (Figura 23) y que nuestro modelo es capaz por tanto de detectar este proceso *in vivo* mediante emisión de luminiscencia.



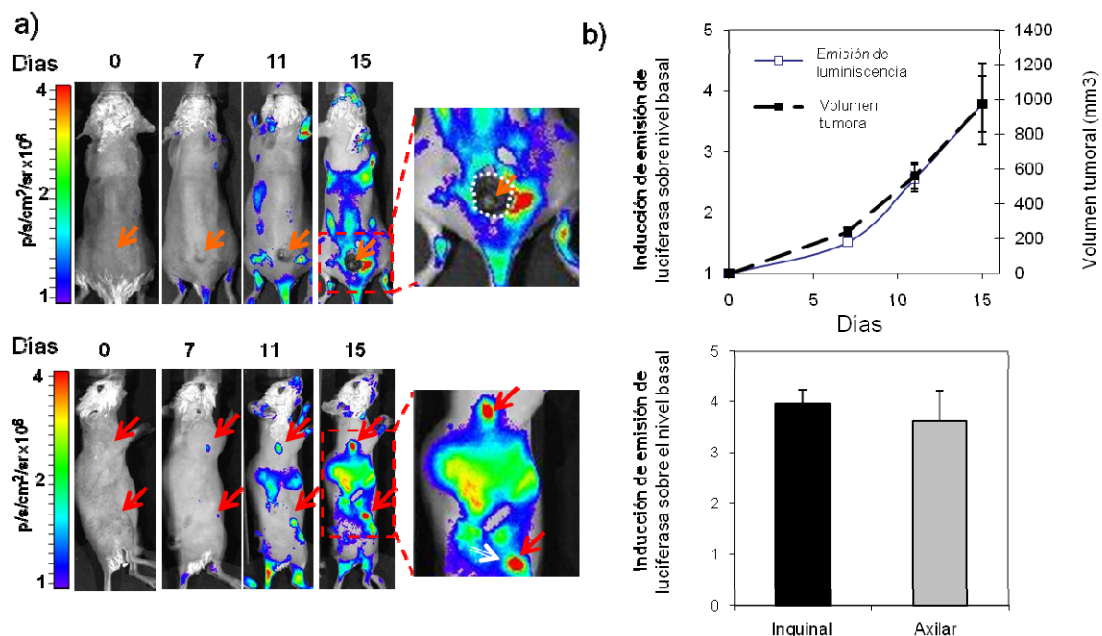
**Figura 23:** a) Fotografía (izquierda) y emisión de luminiscencia (derecha) procedente de los papilomas (flechas negras) originados por el tratamiento de DMBA/TPA b) Inmunohistoquímica para la detección de vasos linfáticos (LYVE1<sup>+</sup>) originados en la periferia de los papilomas. El papiloma se delimita con una línea roja.

## 3.2.2 Ensayos de xenografts en la línea Flt4-EGFPluc

Posteriormente nos propusimos determinar si el modelo Flt4-EGFPluc permitía el seguimiento in vivo de la linfangiogénesis tumoral en ensayos de xenografts por inyección subcutánea de células tumorales. Inicialmente utilizamos una línea celular procedente de melanoma de ratón, la línea B16-V5 (Supino et al. 1986). Se eligió esta línea celular porque es una de las líneas más utilizadas en ensayos de xenograft y está muy caracterizada a este nivel y porque el melanoma es uno de los tumores con mayor grado de metástasis a ganglios linfáticos.

Con el objetivo de reducir la inducción de una respuesta inmune a la inyección de estas células en nuestro modelo, iniciamos el establecimiento de la línea Flt4-EGFPluc en fondo C57BL/6 mediante retrocruzamiento de hembras homocigotas para la construcción Flt4-EGFPluc con machos C57BL/6 portadores de una mutación puntual espontánea en el gen de la tirosinasa que resulta en un fenotipo de albinismo (B6-tyr<sup>c-2J</sup>; Jackson Laboratories, Maine USA).

En ensayos preliminares se utilizó un grupo de hembras heterocigotas para Flt4-EGFPluc de 10-15 semanas de edad que pertenecían a la generación N5 de retrocruzamiento con animales B6-tyr<sup>c-2J</sup> y que por tanto portan aproximadamente un 98% de fondo B6. Aproximadamente  $5 \times 10^5$  células B16-V5 se inyectaron subcutáneamente en la parte media del dorso de cada animal, después de afeitar la zona de la inyección para no causar heridas en la piel y con el fin de eliminar la interferencia del pelo en el seguimiento de la señal de luminiscencia. Se realizó un seguimiento mediante imagen óptica tanto de la respuesta linfangiogénica producida en el área peritumoral como de la respuesta en los ganglios linfáticos proximales (centinelas) y distales (se analizaron los ganglios axilares).



**Figura 24:** Detección de la linfangiogénesis tumoral en el modelo Flt4-EGFPluc en un ensayo de xenograft. a) Imágenes representativas de la Inducción de la emisión de luminiscencia durante el crecimiento tumoral a diversos días del ensayo desde la inyección subcutánea de las células B16V5. Se muestran imágenes ventrales (panel superior) y dorsales (panel inferior). Con flechas naranjas se indica la posición del tumor y las flechas blancas indican la posición de los ganglios linfáticos proximales y distales. b) Panel superior: Cuantificación de la señal de luciferasa en el área peritumoral (eje izquierdo) en relación al crecimiento tumoral (eje derecho). Panel inferior: Cuantificación de la inducción de luminiscencia en los ganglios linfáticos 15 días después del inicio del ensayo.



Como muestra la Figura 24a, debido a la naturaleza melanocítica de las células B16, la emisión de luminiscencia por parte del tumor es absorbida por la melanina haciendo imposible la cuantificación de la linfangiogénesis intratumoral mediante imagen óptica. Sin embargo es posible observar la existencia de una señal de luminiscencia y por tanto un aumento de expresión de VEGFR3 no sólo en la zona peritumoral, sino también en los ganglios linfáticos proximales y distales al tumor (Figura 24a). Se realizó un seguimiento de la inducción de luminiscencia en el área peritumoral en relación con el crecimiento del tumor, y se observó que, existe una relación directa entre el tamaño del tumor y la señal de luminiscencia peritumoral que llega a ser del orden de 4 veces la señal basal de la piel. Al mismo tiempo se realizó un seguimiento del incremento en la emisión de luminiscencia en los ganglios del animal. Se observa una inducción de 4 veces en la señal de luciferasa con respecto al nivel basal de emisión tanto en el ganglio centinela como en los ganglios distales (axilares) (Figura 24 a y b). Por tanto, en este ensayo se puede detectar un incremento de expresión de VEGFR3 tanto en la periferia del tumor como en los ganglios linfáticos que se correlaciona con el crecimiento del tumor y que probablemente refleja la inducción de un proceso linfangiogenico en ambos casos.

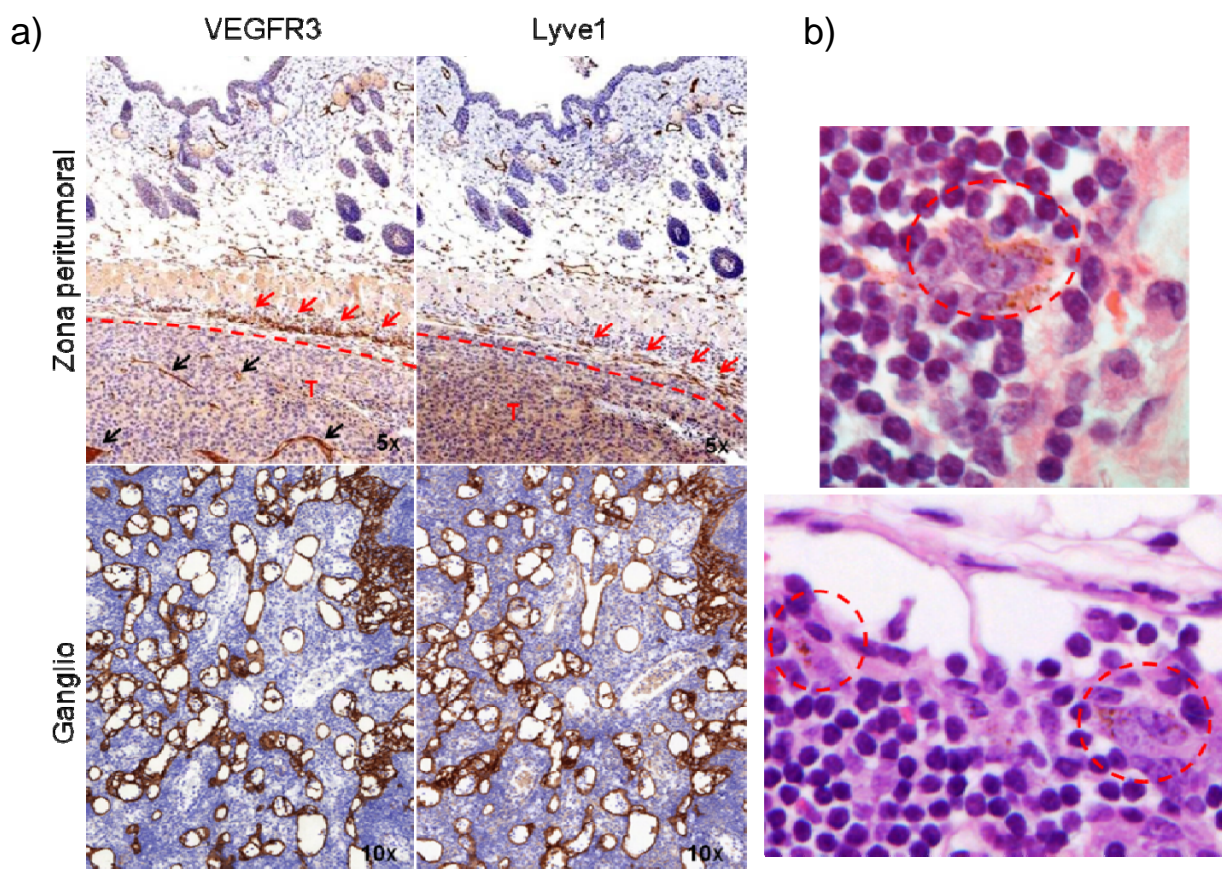


Figura 25: Análisis de los animales inyectados con la línea celular B16-V5. a) Imagen representativa de la inmunohistoquímica frente a VEGFR3 y Lyve en la zona peritumoral y en los ganglios linfáticos. Se observa un incremento en el número y en el calibre de los vasos linfáticos presentes en el ganglio. La línea roja indica el límite de la zona tumoral (T). Los vasos linfáticos se indican con flechas rojas. Con flechas negras se señalan vasos sanguíneos que se encuentran expresando VEGFR3. b) Tinción con Hematoxilina-Eosina de los ganglios linfáticos. Se detecta la presencia aislada de células metastáticas, que se reconocen por su contenido en melanina (señaladas con círculos rojos).

Para comprobarlo se llevó a cabo un análisis histológico tanto de los tumores y la zona peritumoral como de los ganglios linfáticos. La histología de los ganglios pone de manifiesto que la inducción de la emisión de luminiscencia efectivamente se debe a un proceso de linfangiogénesis, ya que se observa un aumento de densidad de vasos linfáticos en los ganglios analizados. Lo mismo sucede en el análisis de la periferia tumoral. Además, en los cortes histológicos se detecta la presencia de células B16-V5 en los ganglios linfáticos, lo que demuestra la expansión del tumor y la formación de metástasis ganglionar (Figura 25).

Teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que el modelo Flt4-EGFPluc permite el análisis de la respuesta linfangiogénica al crecimiento tumoral promovido por una línea celular de melanoma de elevado potencial metastático, tanto en la periferia tumoral como en los ganglios linfáticos del animal.

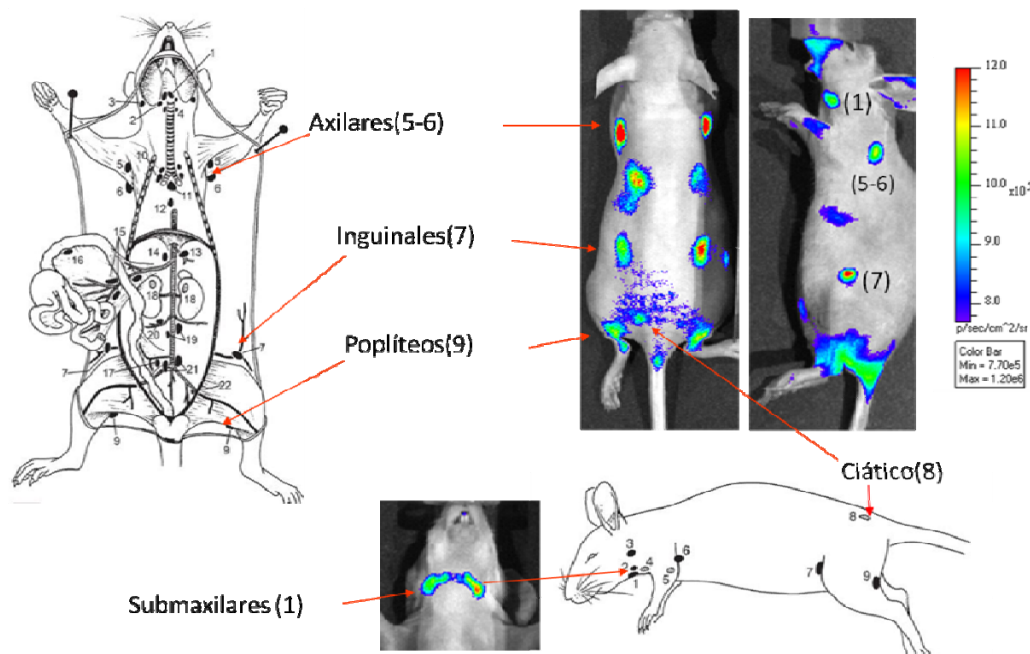
### 3.2.3 Ensayos de xenografts en la línea Flt4-EGFPluc de fondo genético nu/nu

En base a los resultados descritos en el apartado anterior lo siguiente que nos planteamos fue realizar ensayos de xenografts de diferentes líneas tumorales humanas, con diferente potencial metastático, para comprobar si nuestro modelo permitía establecer una relación entre la capacidad metastática y la respuesta linfangiogénica medida por la detección de luminiscencia in vivo en el modelo. La realización de estos ensayos con células humanas requiere, en primer lugar, el establecimiento del alelo Flt4-EGFPluc en un fondo inmunosuprimido. Para ello elegimos ratones atímicos, nude, Nu/J, de *Jackson Laboratories*. Los ratones desnudos se caracterizan por la presencia de una mutación puntual en el gen *Foxn1* que origina la ausencia de timo y de linfocitos T; carecen de inmunidad celular y además la mutación en homocigosis origina la ausencia de pelo. Esta característica facilita el estudio de cualquier proceso por técnicas de imagen molecular no invasivas.

En el ratón, el gen *Flt4* se encuentra localizado en la región B1.2 del cromosoma 11 (49.423.229-49.465.731) y el gen *Foxn1* se encuentra localizado en la región B.5 de ese mismo cromosoma (78.171.079-78.200.060). La proximidad entre ambos genes hace que el establecimiento de la línea que lleve de forma simultánea la construcción Flt4-IRES-EGFPluc y *Foxn1*<sup>nu</sup> por cruces entre ambas líneas sea complicado pues tiene que producirse un doble evento de recombinación entre zonas próximas del genoma y la probabilidad de que esto ocurra disminuye cuanto menor es la distancia entre ambos genes. Sin embargo, la línea se pudo establecer aunque sólo 1 de 110 (en vez de 1 entre 16) animales nacidos de cruces entre animales heterocigotos para Flt4-EGFPluc y para *Foxn1*<sup>nu</sup> portaba las dos mutaciones y una de ellas en homocigosis.

Una vez establecida la línea, que llamaremos de ahora en adelante nu-Flt4-EGFPluc, lo primero que se observó es que en animales de esta línea no sometidos a ningún tratamiento es posible la identificación mediante detección de luminiscencia de los ganglios linfáticos en situación basal (Figura 26). Esto se debe a que los ganglios linfáticos presentan una expresión elevada de VEGFR3 no sólo por parte de los vasos linfáticos aferentes y eferentes o por los plexos linfáticos presentes en el ganglio, sino

también por la expresión del receptor por parte de las vénulas de endotelio alto que forman también parte del ganglio. El pelaje en otros fondos genéticos interfiere con esta señal basal de luminiscencia emitida por los ganglios linfáticos.



**Figura 26.** Emisión de luminiscencia de los ganglios linfáticos de la línea Flt4-EGFP-luc-Nude en situación basal y su correspondencia anatómica.

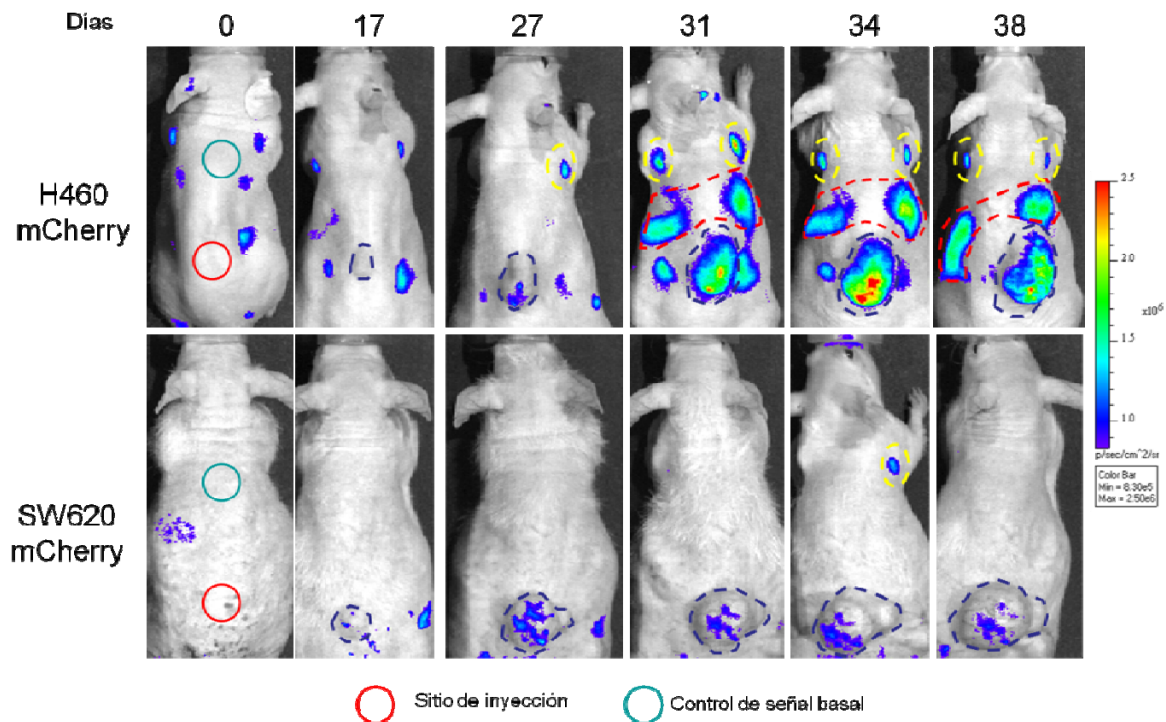
Inicialmente en la línea nu-Flt4-EGFP-luc se realizaron ensayos de xenograft con dos líneas celulares humanas, ambas descritas como capaces de formar metástasis cuando se inyectan subcutáneamente en ratones inmunosuprimidos aunque con diferente potencial metastático: la línea H460, de carcinoma de pulmón, con alto potencial metastático (Banks-Schlegel et al. 1985), y la línea SW620 de carcinoma de colon, con moderado potencial metastático (Fogh et al. 1977). Estas líneas celulares fueron transfectadas previamente con un plásmido que expresa la proteína fluorescente roja mCherry (Apartado 15 de Materiales y Métodos). El marcaje de las células con fluorescencia permite el seguimiento del crecimiento tumoral mediante la emisión de fluorescencia por parte de las células del tumor así como la localización de posibles metástasis. El seguimiento de la linfangiogénesis asociada a éste crecimiento tumoral se realiza mediante la emisión de luminiscencia debida a la mutación que porta el modelo.

Para el ensayo se utilizaron hembras, heterocigotas para Flt4-EGFP-luc y homocigotas nu/nu de 15 semanas de edad. Un grupo de 4 hembras fue inyectado con la línea celular H460-mCherry, y otro grupo con la línea SW620-mCherry. Se inyectaron  $5 \times 10^6$  células de cada una de las líneas celulares de forma subcutánea en la zona dorsal de cada animal y se midió la emisión de luminiscencia a diversos tiempos tras la inyección para analizar la respuesta linfangiogénica en cada uno de los grupos.

Lo primero que se observa es que la emisión de luminiscencia de los animales inyectados con la línea celular H460-mCherry es significativamente más alta que la de los inyectados con SW620-mCherry, no sólo en el área peritumoral, sino también a nivel sistémico, en particular en los ganglios linfáticos y posiblemente también en hígado y bazo (Figura 27).

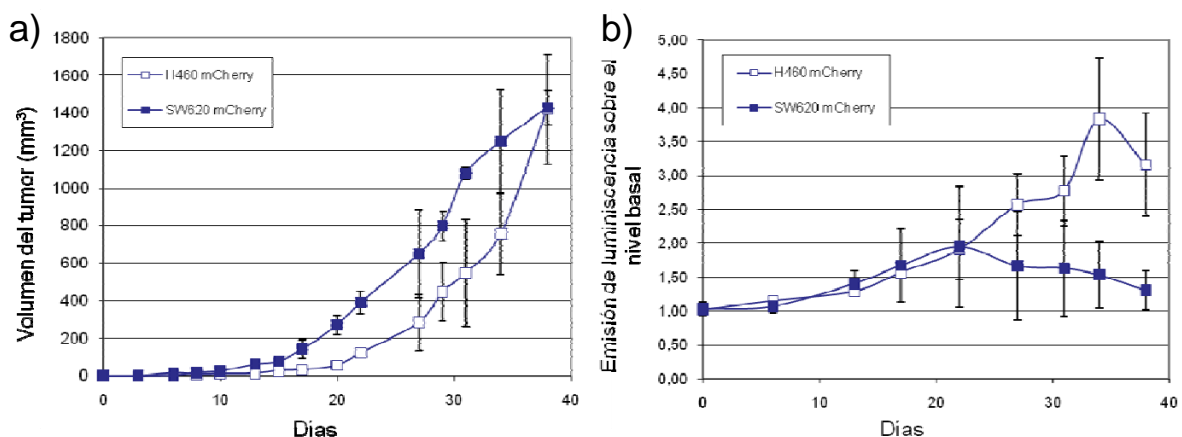


## Resultados



**Figura 27:** Comparación en los niveles de emisión de luminiscencia durante el crecimiento tumoral en ensayos de xenograft en las dos líneas celulares del ensayo, la H460mcherry y la SW620mcherry. La emisión de luminiscencia en los animales inyectados con la línea celular H460 es significativamente superior a la de los animales inyectados con la línea SW620, tanto en la zona peritumoral (señalada con una línea azul discontinua) como a nivel sistémico. Se marca con una línea roja discontinua la señal procedente de hígado y bazo. En amarillo se indica la señal procedente de los ganglios linfáticos axilares.

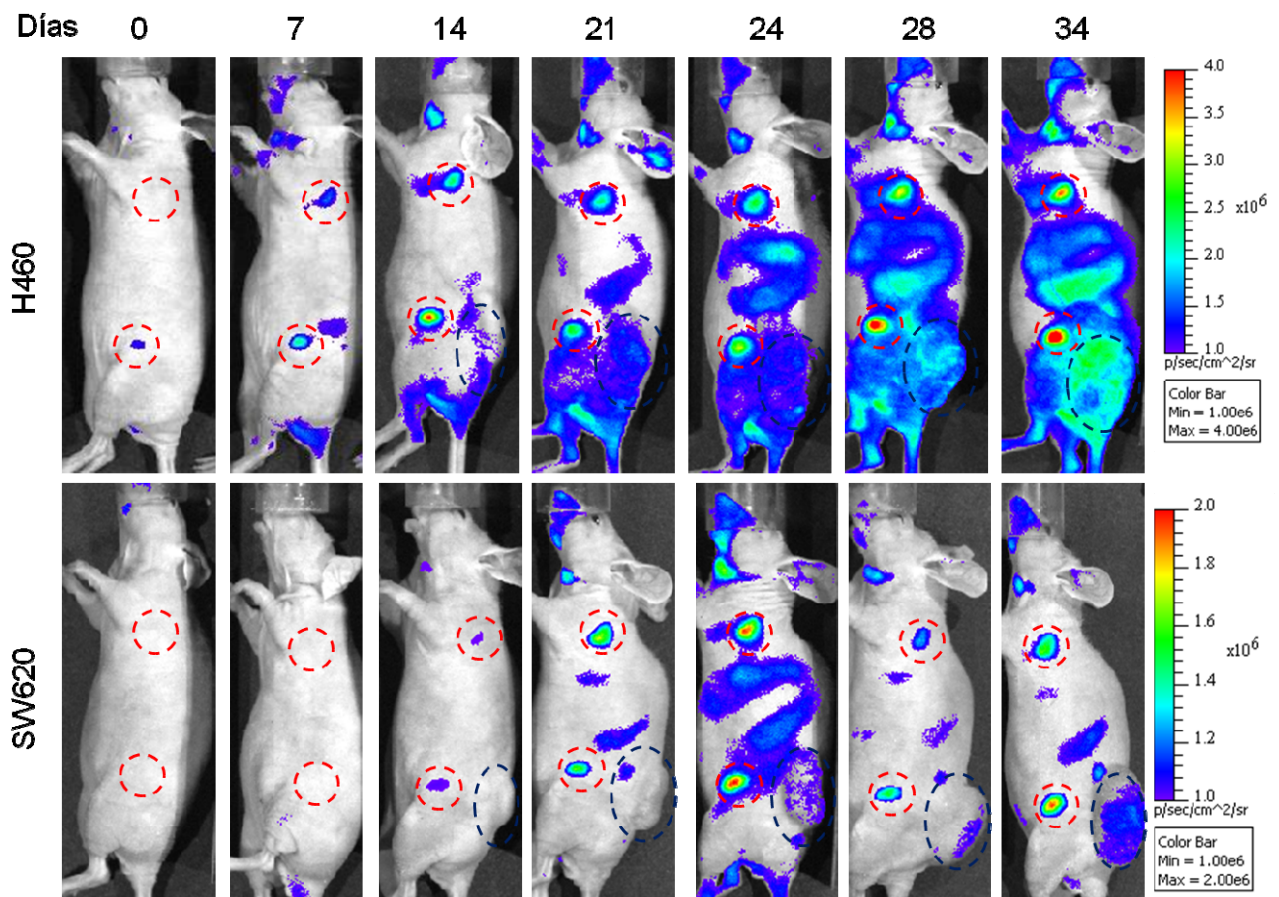
En la Figura 28 se muestra la cuantificación del volumen del tumor y de la emisión de luminiscencia en el área tumoral, para ambos tipos celulares, a diferentes tiempos del ensayo. La cinética de crecimiento del tumor es similar para ambas líneas. En ambos grupos se alcanza el mismo volumen tumoral ( $1400\text{mm}^3$ ) en el mismo tiempo (38 días) (Figura 28a). Sin embargo, en el análisis de la emisión de luminiscencia, se observa que para la línea SW620 apenas se produce un incremento de la emisión de 2 veces sobre el nivel basal, tomando como referencia una zona no afectada por el tumor, mientras que para la línea H460 el incremento en la emisión es de 4 veces sobre el nivel basal (Figura 28b).



**Figura 28:** a) Análisis del crecimiento tumoral y b) cuantificación de luminiscencia para las líneas celulares H460mCherry y SW620mCherry en ensayos de xenograft.



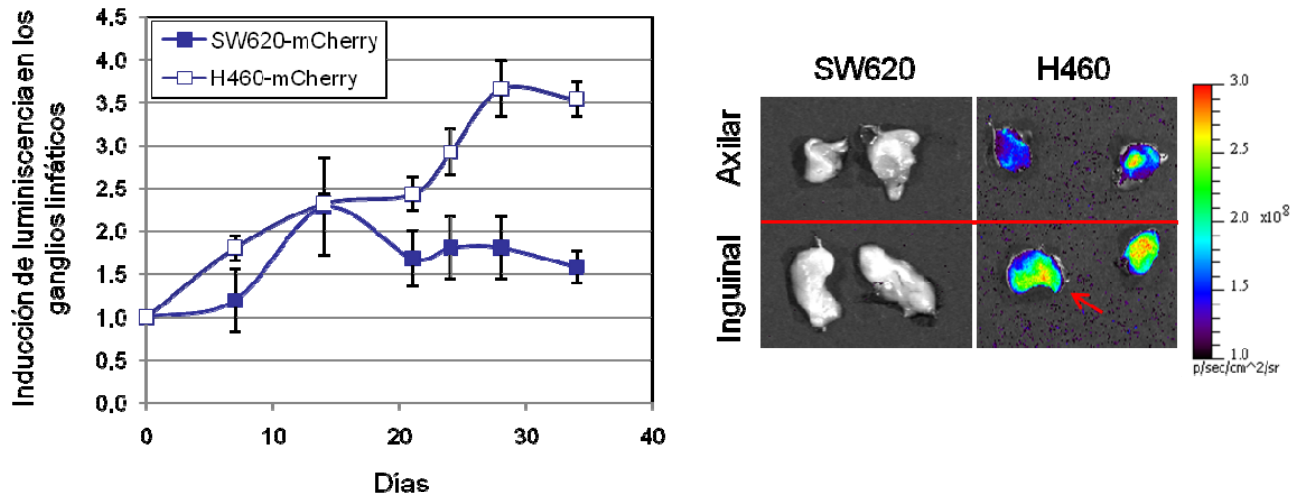
Además de la inducción de luminiscencia en el área peritumoral en los animales inyectados con la línea H460, se puede observar también un alto nivel de inducción en la emisión de luminiscencia en los ganglios linfáticos tanto proximales como distales del animal, así como un incremento de señal más generalizado cuyo origen específico se desconoce por el momento. La señal de luminiscencia en los ganglios aumenta a medida que aumenta el volumen tumoral (Figura 29), aunque el incremento en señal es más pronunciado entre los 25 y los 35 días, coincidiendo también con la fase de crecimiento más acelerado del tumor (Figura 28a) y con el pico de emisión de luminiscencia en la región peritumoral (Figura 28b). En el punto máximo la inducción de luminiscencia en el ganglio es de unas 4 veces el nivel basal (Figura 30).



**Figura 29:** Análisis de la emisión de luminiscencia en los ganglios linfáticos de los animales inyectados con la línea H460 (panel superior) y con la SW620 (panel inferior). Los ganglios tanto proximales como distales al tumor aparecen señalados con un círculo rojo y el tumor se señala en negro. La línea H460 origina una inducción en la emisión de luminiscencia superior a la línea SW620, tal y como se presenta en la figura.

Con objeto de relacionar la inducción de señal de luminiscencia en los ganglios inguinales y axilares con la presencia de células tumorales en los mismos, éstos se extrajeron del animal al final del ensayo para verificar si en alguno de ellos se detectaba fluorescencia procedente de la proteína mCherry, lo que indicaría la presencia de células tumorales. Se detectó emisión de fluorescencia en todos los ganglios de los animales inyectados con la línea celular H460 (Figura 30b) pero de una forma más evidente en el ganglio centinela (el ganglio inguinal más próximo al tumor). En este ganglio se verificó la presencia de células tumorales mediante histología.

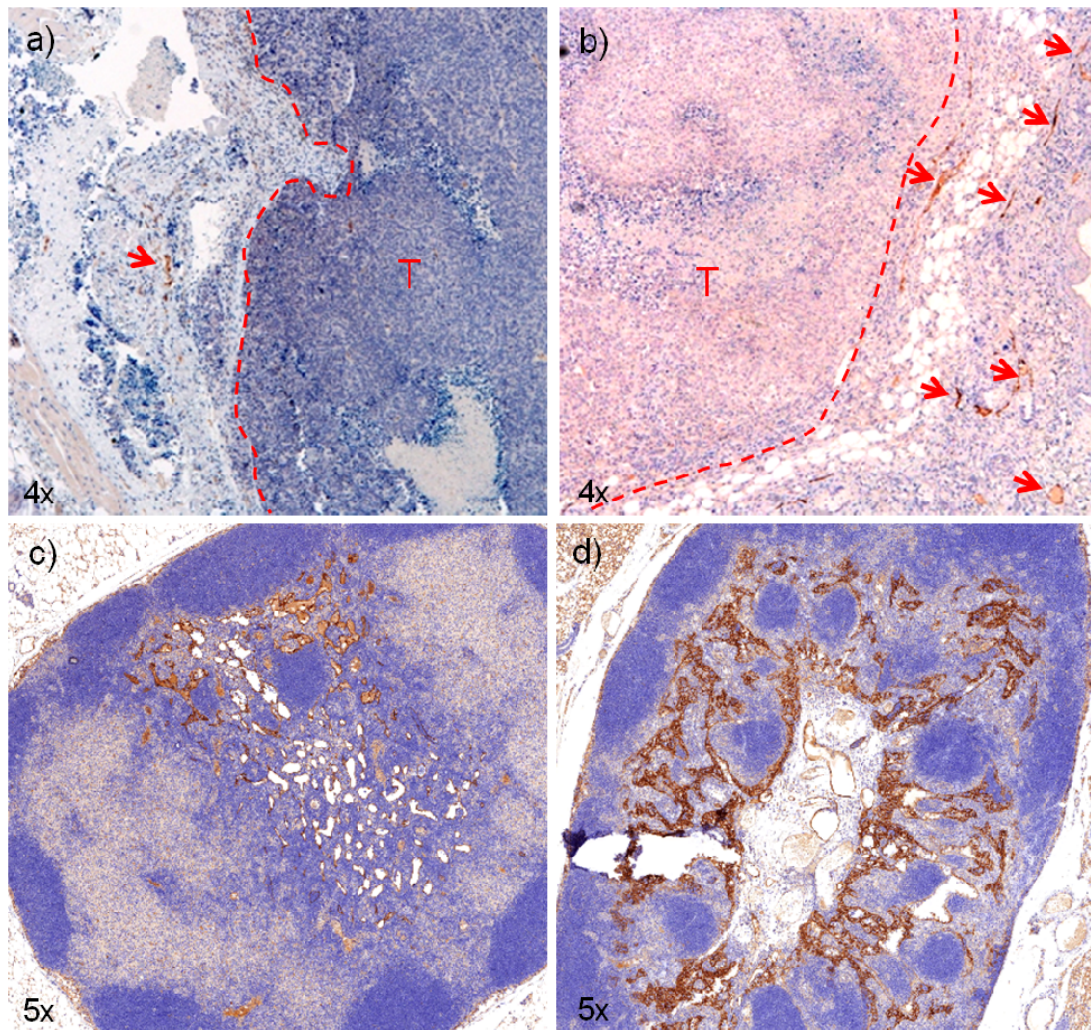
## Resultados



**Figura 30:** a) Cuantificación de la emisión de luminiscencia de los ganglios linfáticos de los animales inyectados con la línea celular H460 y SW620. Con la línea H460 se produce un incremento en la emisión de luminiscencia de hasta 4 veces el nivel basal. b) Detección de fluorescencia en los ganglios axilares (distales) e inguinales (proximales). Se obtuvo emisión de fluorescencia en todos los ganglios de animales inyectados con H460, pero de una manera más evidente en el ganglio centinela (flecha roja). Para la línea SW620 no se detectó fluorescencia a nivel de los ganglios.

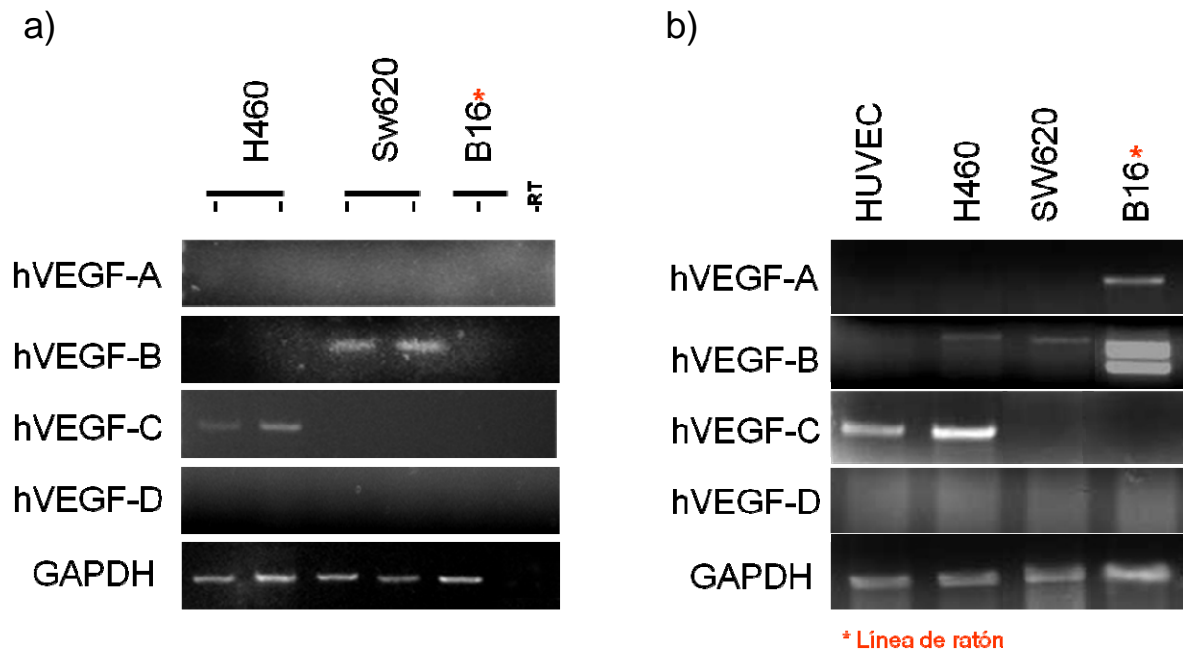
Con objeto de comprobar que el incremento de luminiscencia tanto en el área peritumoral como distal (en los ganglios linfáticos), que refleja un aumento en los niveles de expresión global de VEGFR3, refleja también un aumento en el número de vasos linfáticos y no otro tipo de proceso que resulte en el mismo efecto (por ejemplo reclutamiento de macrófagos VEGFR3+), se realizó un análisis por inmunohistoquímica con anticuerpos anti-VEGFR3. Este análisis puso de manifiesto la inducción de linfangiogénesis en torno al tumor generado por la línea H460mcherry y una hiperplasia de los plexos linfáticos del ganglio centinela en este mismo grupo de animales. Sin embargo, no se observó la existencia de procesos de linfangiogénesis en el tumor originado por la línea SW620mcherry y los ganglios linfáticos en estos animales no presentaban hiperplasia de los plexos linfáticos. Por tanto el incremento en la señal de luminiscencia en este ensayo refleja un aumento en el número de vasos linfáticos y refleja una medida de linfangiogénesis tumoral. De nuevo estos resultados ponen de manifiesto la utilidad del modelo Flt4-EGFPluc para el estudio de procesos tumorales y metástasis mediante técnicas de imagen no invasivas, así como su potencial utilidad para el ensayo de fármacos dirigidos a controlar estos procesos (Figura 31).





**Figura 31:** Inmunohistoquímica frente a VEGFR3 de la zona peritumoral y de los ganglios linfáticos de los animales inyectados con la línea celular H460 y SW620. a) Zona peritumoral con la línea SW620. B) Zona peritumoral en los H460. En ambos casos la línea roja identifica el límite de la zona tumoral (T); los vasos linfáticos están indicados con flechas rojas. c) Ganglio centinela de SW620 d) Ganglio centinela de animales inyectados con la línea celular H460mCherry.

Para tratar de explicar la diferente capacidad linfangiogénica de las dos líneas celulares ensayadas, se realizó un análisis de expresión de los distintos factores de crecimiento vascular endotelial (VEGFs) mediante extracción de ARN del tumor y RT-PCR para VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D utilizando oligonucleótidos que reconocen la secuencia humana, para determinar si existe alguna relación entre la diferente expresión de alguno de estos factores y la diferente vascularización observada en los dos tipos de tumores. Como resultado de dicho análisis se encontró que el tumor originado por la línea H460mCherry expresa VEGF-C mientras que la expresión de VEGF-C en el tumor originado por la línea SW602mCherry no es detectable por RT-PCR (Figura 31). Está descrito que VEGF-C participa en procesos tumorales induciendo, mediante su unión a VEGFR3, la proliferación de vasos linfáticos periféricos al tumor y vasos linfáticos intratumorales, así como una respuesta linfangiogénica a nivel ganglionar (He et al. 2005). Todos estos procesos facilitan la metástasis de las células del tumor a los ganglios linfáticos (revisado en Alitalo 2008).



**Figura 31:** a) RT-PCR de los tumores originados por las líneas celulares H460mCherry, SW620mCherry y B16 para los distintos factores de crecimiento vascular endotelial. Se presentan datos de dos animales para cada tipo celular. La RT-PCR de GAPDH se presenta como control de carga. b) RT-PCR de las líneas celulares H460, SW620 y B16. Se muestra además la RT-PCR de una línea de células vasculares endoteliales humanas (HUVEC).

Por tanto, la mayor expresión de VEGF-C en los tumores originados por la línea H460 puede explicar, en parte, el diferente comportamiento observado entre las dos líneas. Por otro lado, tumores SW620mCherry presentan expresión de VEGF-B que está relacionada con la estimulación del sistema vascular sanguíneo pero no con el linfático. El diferente patrón de expresión de estos dos factores en los tumores generados por las dos líneas celulares puede explicar parcialmente el diferente grado de invasión metastática vía linfática de ambos tumores.

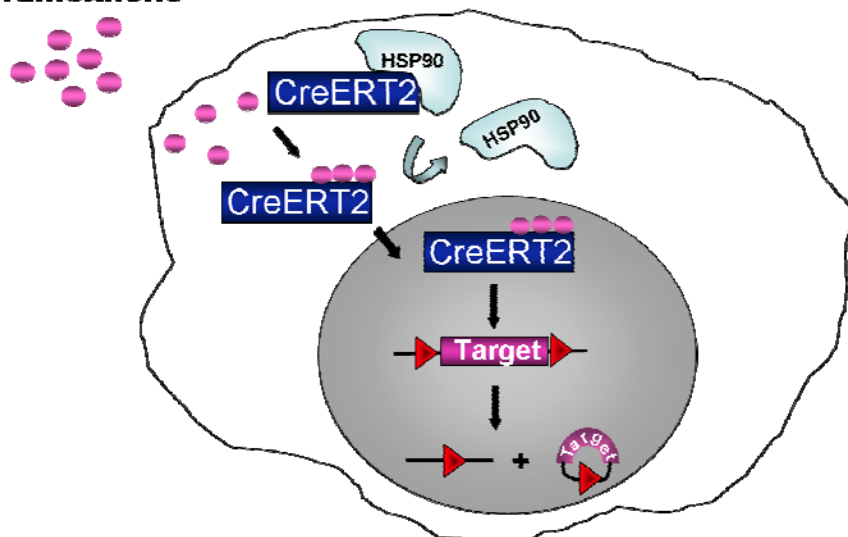
## Parte II: Generación, caracterización y aplicaciones del modelo Flt4-CreERT<sup>2</sup>

### 4. Generación de la línea Flt4-IRES-CreERT<sup>2</sup>

Otro de los objetivos descritos para esta tesis, era la generación de una línea de ratón que permitiese la introducción de modificaciones genéticas controladas (knockout, *knockin* o transgénicos condicionales) específicamente en las células endoteliales linfáticas del ratón. El objetivo último de la generación de esta herramienta, es el estudio de la función de distintos genes en el desarrollo y funcionalidad del sistema linfático, sobre todo en procesos de crecimiento y progresión tumorales. Para ello hemos generado una línea *knockin* que expresa la fusión CreERT<sup>2</sup> específicamente en células endoteliales linfáticas. En el momento en el que se inició este trabajo no existía ningún otro modelo que permitiese expresar la recombinasa Cre de forma específica en el endotelio linfático. Recientemente se ha obtenido una línea *knockin* que expresa la recombinasa CreERT<sup>2</sup> bajo las señales reguladoras del gen Prox1, otro de los marcadores específicos de endotelio linfático (Ver apartado 3 de la introducción). (Srinivasan et al. 2007, Johnson et al. 2008).

La estrategia empleada para la construcción de este modelo es básicamente la misma que la utilizada para la construcción del modelo reporter Flt4-EGFPluc y consiste en la construcción de un RNA mensajero bicistrónico que codifica de forma simultánea para el receptor VEGFR3 y para la recombinasa CreERT<sup>2</sup> inducible. Al igual que ocurre en la línea Flt4-EGFPluc, en este modelo la expresión de la recombinasa CreERT2 debe recapitular la expresión del gen Flt4, y por tanto se expresará exclusivamente en aquellas células que expresan Flt4. Además su expresión deberá inducirse en aquellos procesos con los que se produzca una inducción de la expresión de Flt4. De éste modo habrá expresión de la recombinasa Cre sólo en aquellos lugares en los que haya expresión de Flt4, por lo que teniendo en cuenta la especificidad de éste receptor para endotelio linfático, este modelo permitirá la realización de modificaciones genéticas controladas de forma específica en el endotelio linfático.

#### Tamoxifeno



**Figura 32:** Esquema del funcionamiento de la recombinasa CreERT<sup>2</sup> tras la administración de tamoxifeno

Pero este modelo permite no sólo la modificación genética mediada por Cre de cualquier alelo portador de secuencias loxP en el endotelio linfático, sino que permite además controlar temporalmente estas modificaciones genéticas. La utilización de la fusión entre la secuencia codificante de dicha recombinasa y una forma mutada del dominio de unión a ligando del receptor de estrógeno (ERT<sup>2</sup>) que reduce su afinidad por el ligando endógeno y aumenta su afinidad por el ligando sintético 4-OH-Tamoxifeno (Metzger and Chambon 2001), hace que dicha proteína de fusión quede retenida en el citoplasma de células que la expresan unida a proteínas chaperonas del tipo Hsp90. La activación de la proteína de fusión se logra mediante la administración de tamoxifeno, que es convertido a 4-OH-tamoxifeno y que interacciona con el receptor mutado (ERT<sup>2</sup>) induciendo la translocación nuclear de la proteína de fusión CreERT<sup>2</sup> y por tanto de la recombinasa (Figura 32).

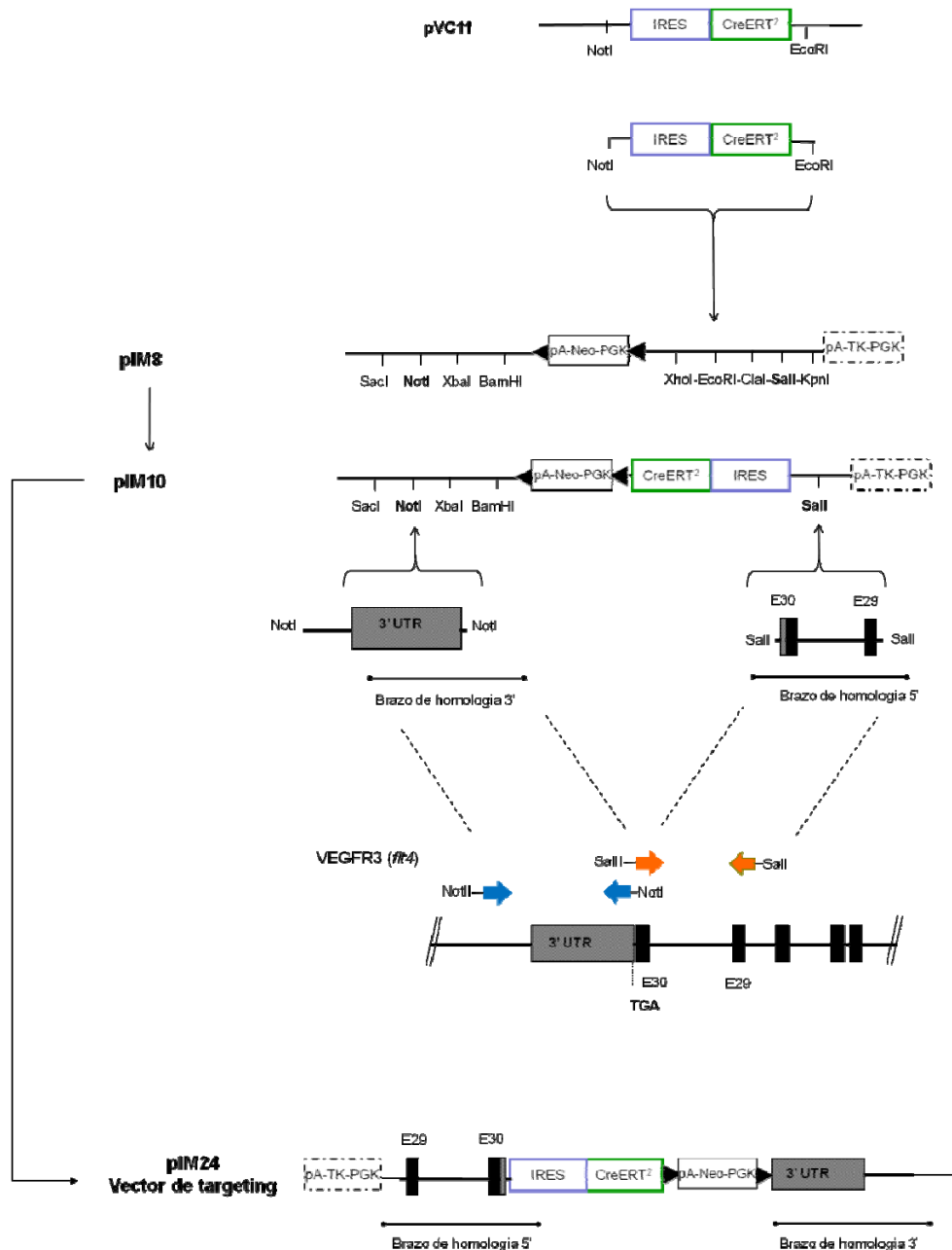
### 4.1 Construcción del vector de *targeting*

La estrategia empleada para la generación del vector de *targeting* Flt4-CreERT<sup>2</sup> se describe en la figura 33. Dado que es la misma que la utilizada para la generación del alelo Flt4-EGFPluc, muchos de los elementos de la construcción son idénticos, entre ellos, los brazos de homología, que son los mismos que los diseñados para la otra construcción (Figura 33).

El plásmido sobre el que se realizan los clonajes es también el mismo descrito para la elaboración del vector Flt4-EGFPluc, que contiene los casetes de selección positiva PGK-neo, y de selección negativa, PGK-TK (pIM8). Sobre él se llevó a cabo el clonaje del casete IRES-CreERT<sup>2</sup>. La fusión CreERT<sup>2</sup> que codifica la recombinasa Cre inducible por 4-OH-tamoxifeno se ha obtenido del laboratorio del Dr. Daniel Metzger. A esta fusión se le ha añadido una secuencia IRES (sitio de entrada interno de ribosomas) del virus de la encefalomiocarditis en el extremo 5' (plásmido pVC11) (Guerra et al. 2003). El casete IRES-CreERT<sup>2</sup> se incorpora al plásmido pIM8 mediante sitios de restricción EcoRI/NotI dando lugar al plásmido pIM10, que es un vector diseñado para construir a partir de él, mediante clonaje de los brazos de homología correspondientes, cualquier vector de *targeting* para dirigir la fusión IRES-CreERT<sup>2</sup> a cualquier posición en el genoma. Contiene sitios de restricción NotI y Sall únicos para el clonaje de los brazos de homología del gen de interés (Figura 33).

Una vez clonados los brazos de homología, se eliminó un sitio de restricción NotI por digestiones parciales con el objetivo de conseguir un sitio de restricción único, necesario para linearizar el vector y electroporarlo en células ES. Se obtuvo así el vector de *targeting* definitivo pIM24 (Figura 33).



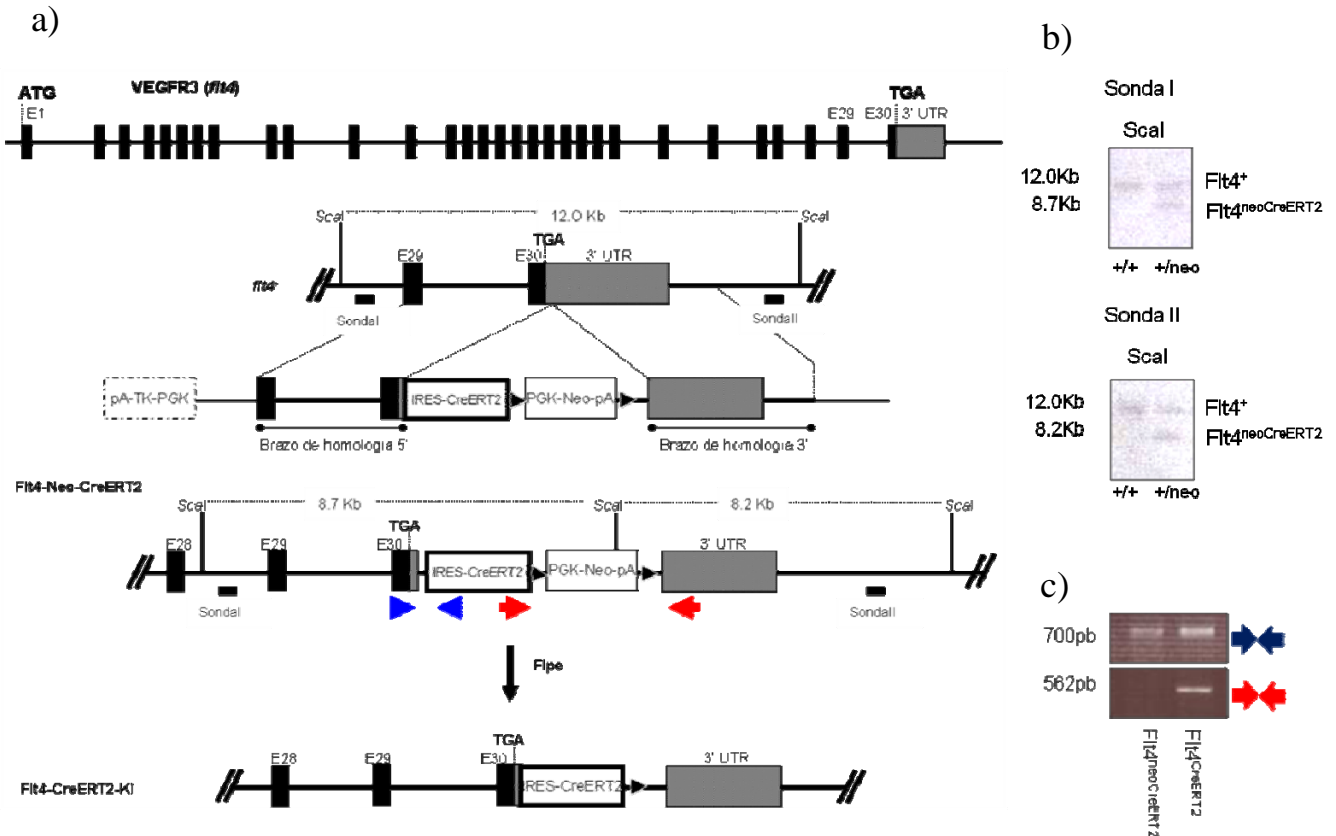


**Figura 33:** Representación esquemática de la construcción del vector de *targeting* para la generación del modelo Flt4-CreERT<sup>2</sup>

## 4.2 Obtención de clones recombinantes homólogos

Construido el vector, éste se linearizó mediante digestión con la enzima de restricción *NotI* para electroporarlo en células madre embrionarias (ES) de la línea V6.4 F1 (C56BL6x129). El protocolo de la electroporación se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 3 de materiales y métodos. El análisis de los clones recombinantes homólogos se realizó mediante *southern blot* utilizando las mismas sondas descritas para el *screening* de los clones recombinantes homólogos de la construcción Flt4-EFPlus.

(Apartado 1.2 de resultados). El DNA genómico extraído se digirió con la enzima *ScaI*. En este caso, el tamaño de los fragmentos obtenidos por hibridación con la sonda I era de 12Kb para el alelo WT y 8.7Kb para el recombinante, y para la hibridación con la sonda II el tamaño de las bandas era de 12Kb y 8.2Kb para el alelo WT y recombinante respectivamente. Se analizaron un total de 57 clones de los cuales 25 resultaron positivos para ambos brazos de homología (Frecuencia de recombinación homóloga aproximadamente 44%) (Figura 34a y b).



**Figura 34:** Generación del modelo *Flt4-CreERT2*: estrategia de gene targeting.

a) Esquema de la estructura del gen *Flt4*, el vector de gene targeting utilizado y el alelo obtenido por recombinación homóloga en células ES. Se muestra además la posición de los sitios de restricción *ScaI* utilizados en el análisis por *southern blot* de los clones recombinantes así como la posición de los fragmentos de DNA empleados como sondas en dicho análisis. Finalmente se muestra la estructura del alelo recombinado una vez eliminado el casete de selección positiva (PGK-Neo) mediante la actividad de la recombinasa Flp.

b) Análisis de clones recombinantes mediante *southern blot*. Se muestra el tamaño de las bandas correspondientes a los alelos WT (*Flt4*+) y recombinante (*Flt4-Neo-CreERT2*)

c) La escisión del casete PGKneo por la recombinasa Flp fue analizado mediante PCR con los primers indicados en la figura a) para diferenciar *Flt4-Neo-CreERT2* (flechas rojas) y *Flt4-CreERT2* (flechas azules).

## 4.3 Generación de quimeras y transmisión en la línea germinal

Dos de los clones recombinantes homólogos, ESIM14.15 y ESIM14.56, que mostraban un cariotipo euploide (40 cromosomas en metafase) y buena morfología, se incorporaron a embriones en estado de



mórula mediante la técnica de agregación (Apartado 4 de materiales y métodos). Se obtuvieron 2 machos con el 100% de contribución para cada clon, utilizando como criterio de quimerismo la aparición de pigmentación agouti en el pelo (Tabla III).

Clon	nº cel agregadas	nº emb. agregados transferidos	nº de crías vivas	nº de quimeras	Sexo (% quimerismo)
ESIM14.56 (p4)	4 - 8	60	6	2	2M (100%)
ESIM14.15 (p3)	4 - 8	37	5	2	2M (100%)

**Tabla III:** Resultado de la incorporación de los clones recombinantes homólogos ESIM14.15 y ESIM14.56 a embriones en estado de mórula mediante la técnica de agregación. En la tabla se indican los datos, el número de quimeras y el grado de quimerismo de cada una para cada clon.

Para analizar la contribución de las células ES recombinantes a la línea germinal, se cruzaron las cuatro quimeras macho obtenidas en la agregación con hembras CD1 albinas y se analizó la aparición de crías pigmentadas en la descendencia. Todas las quimeras transmitieron la pigmentación a su descendencia con una frecuencia del 100%, lo que indica que su línea germinal deriva enteramente de las células ES recombinantes. Se analizaron un total de 67 crías por PCR para comprobar la presencia del alelo recombinante Flt4-neo-CreERT2 utilizando para ello los oligonucleótidos Flt4-08F/Flt4-02R y Flt4-08F/pBS-IRES-R2 que amplifican una banda de 591pb y 700pb para el alelo WT y recombinante respectivamente (Apartado 6 de Materiales y Métodos). 28 crías de las 67 poseían el alelo recombinante (Tabla IV).

Clon	%pigmentación de la quimera	nº de crías	Transmisión de pigmentación (%)	Transmisión de la construcción (%)
ESIM14.56 (p4)	(2) 100%	33	33/33 (100)	15/33 (45)
ESIM14.15 (p3)	(2) 100%	34	34/34 (100)	13/34 (38)

**Tabla IV:** Análisis de la transmisión de las quimeras. Número de crías analizadas y porcentajes de transmisión de la pigmentación y de la construcción para cada clon.

#### 4.4 Eliminación *in vivo* del casete de selección PGK-Neo

Igual que en el modelo anterior, los animales portadores del alelo recombinante Flt4-neo-CreERT<sup>2</sup> se cruzaron con la línea transgénica TgpCAG-Flpe, que expresa la recombinasa Flpe bajo el control del promotor pCAG (promotor de la  $\beta$ -actina y el *enhancer* de citomegalovirus) de forma ubicua. Esta línea expresa la recombinasa Flpe de forma ubicua. La recombinasa actúa sobre los sitios Frt que flanquean el casete de resistencia a Neomicina dando lugar de esta manera al alelo *knockin* (Flt4-CreERT<sup>2</sup>). La eliminación del casete de resistencia se analizó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos Flt4-

02R/CreF3 (indicados en la figura 34 con flechas rojas) que amplifican una banda de 562pb en el caso de que el casete de Neo se haya escindido (Figura 34c). Los animales heterocigotos para el alelo Flt4-CreERT<sup>2</sup> se cruzaron posteriormente entre ellos para la obtención de animales homocigotos. La frecuencia de animales homocigotos nacidos de estos cruces fue aproximadamente del 25%, indicando que la mutación en homocigosis no resulta en letalidad embrionaria o perinatal.

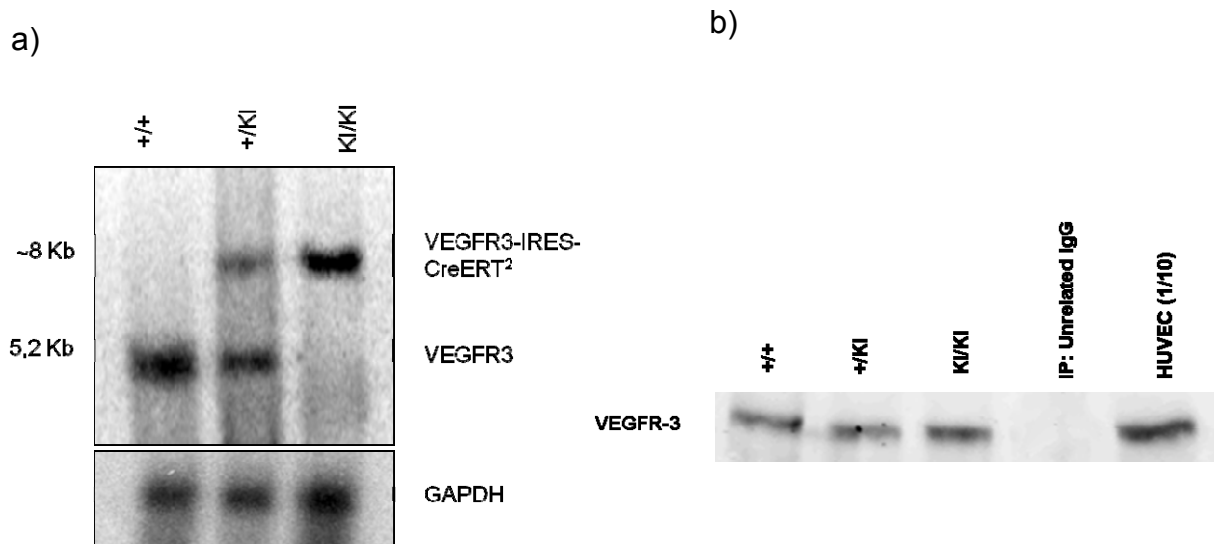
## 5. Caracterización de la línea Flt4-CreERT<sup>2</sup>

### 5.1 Análisis de expresión de Flt4

Una vez establecida la línea portadora de la construcción Flt4-CreERT<sup>2</sup> se llevaron a cabo análisis de expresión de RNA mensajero y de proteína con el objetivo de verificar que la introducción de la secuencia IRES-CreERT<sup>2</sup> en la región 3'UTR del gen Flt4 no hubiese originado una alteración en los niveles de expresión de dicho gen.

El análisis por *northern blot* de la expresión de RNA mensajero, al igual que en el caso del modelo Flt4-EGFPluc, se llevó a cabo en embriones de 13.5 días de desarrollo de diferentes genotipos (silvestre, heterocigoto y homocigoto) utilizando la misma sonda correspondiente a la región 3' no traducida del gen Flt4. El tamaño obtenido para el RNA mensajero es el esperado para cada uno de los genotipos, para el alelo silvestre son 5,2Kb y para el alelo bicistrónico son 8Kb. Como control de carga se utilizó GAPDH (Figura 35a). Como se puede observar en la figura 35a, la intensidad de las bandas es comparable entre el genotipo silvestre y el homocigoto, sin embargo en el heterocigoto existe una ligera diferencia en la intensidad de la banda correspondiente al RNA bicistrónico con respecto a la banda silvestre. Esta diferencia puede ser debida a que la construcción IRES-CreERT<sup>2</sup> pueda estar alterando la estabilidad del RNA mensajero bicistrónico.

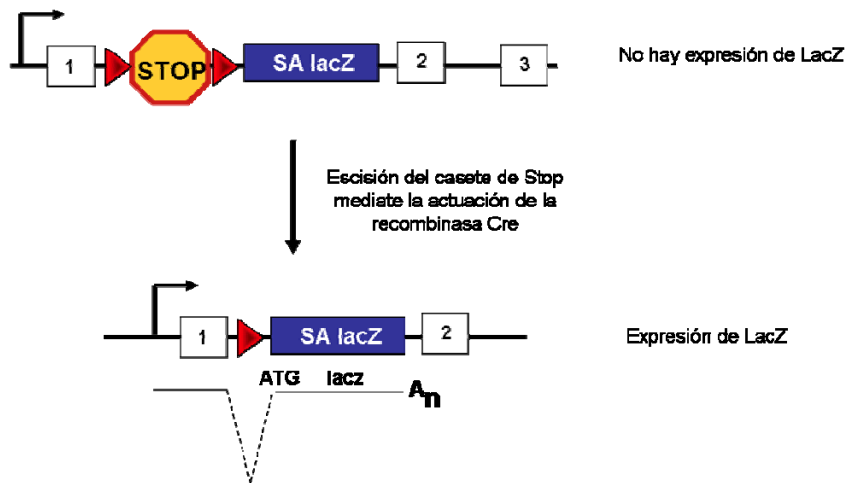
El análisis de los niveles del receptor VEGFR3 se realizó también en embriones a día E13.5 de desarrollo. Se partió de un extracto de proteína obtenido a partir de embriones y en primer lugar se realizó una inmunoprecipitación del receptor a partir del extracto total con un anticuerpo anti VEGFR3 como se describe en el apartado 8 de materiales y métodos. El material inmunoprecipitado se sometió posteriormente a un análisis por *western blot* utilizando el mismo anticuerpo. Se utilizó como control un extracto de proteína procedente de un cultivo de células endoteliales humanas HUVEC's (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Los niveles de expresión de Flt4 permanecen constantes para los genotipos analizados, indicando de ésta manera que la introducción de la construcción IRES-CreERT<sup>2</sup> no afecta a los niveles de expresión fisiológicos del gen (Figura 35b).



**Figura 35.** a) Análisis de la expresión de VEGFR3 en embriones de 13,5 días de desarrollo mediante northern blot. El tamaño de las bandas obtenidas es el esperado para el alelo silvestre y recombinante. b) Análisis de la expresión de VEGFR3 mediante inmunoprecipitación y western blot de embriones de 13.5 días de desarrollo.

## 5.2 Análisis del patrón de expresión y de la activación de la recombinasa en el modelo Flt4-CreERT<sup>2</sup>: Cruce con la línea trazadora de la actividad de Cre: ROSA26LSLlacZ

Con el objetivo de verificar que la expresión de la recombinasa Cre inducible de nuestro modelo es específica de células endoteliales linfáticas, se estableció el cruce de ésta línea con una línea trazadora de la actividad de Cre, la Rosa26LSLlacZ (Mao et al. 1999). Ésta línea se caracteriza porque posee el gen de la  $\beta$ -galactosidasa bacteriana precedido de una secuencia Stop que se encuentra flanqueada por dos sitios LoxP. La secuencia Stop contiene señales de terminación de la transcripción que interfieren con la expresión de lacZ. Una vez deletada esta secuencia mediante la recombinación mediada por Cre la transcripción tiene lugar permitiendo la expresión de LacZ bajo el control del promotor del locus Rosa26. La administración de tamoxifeno a animales portadores de los dos alelos Flt4-CreERT<sup>2</sup> y R26LSLlacZ activa la recombinasa Cre, que actúa sobre los sitios LoxP que flanquean la secuencia Stop produciendo la escisión de la misma y dando lugar a la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa, que en presencia del sustrato X-Gal origina un precipitado de color azul, dando como resultado una coloración azul en las células en las que haya expresión de Flt4 (Figura 36).



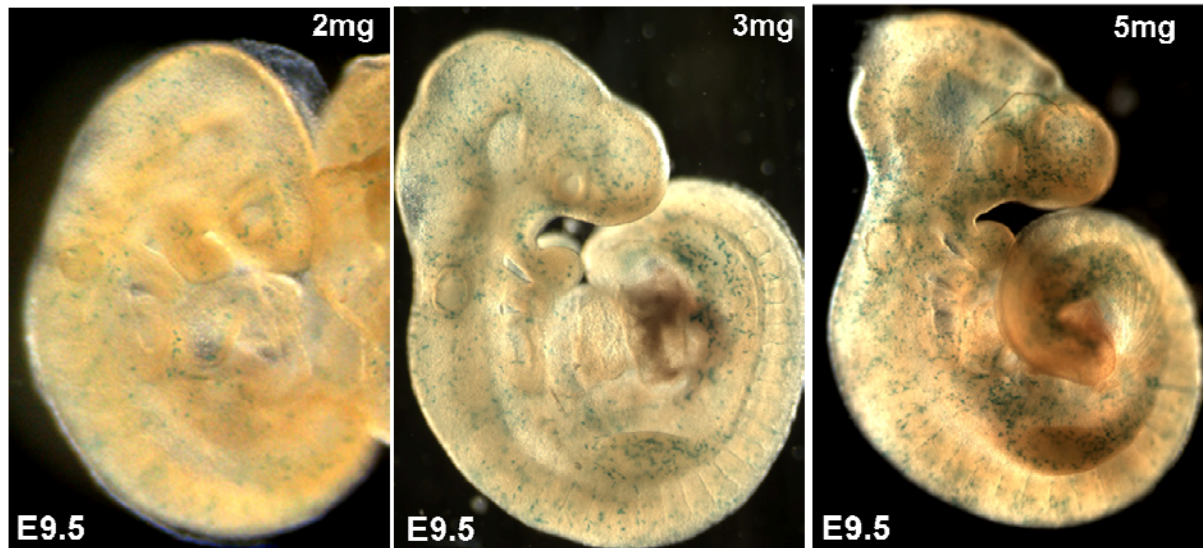
**Figura 36:** Esquema del funcionamiento de la línea trazadora de la actividad de Cre Rosa26LSLlacZ. SA=Aceptor de *splicing*

Para establecer la línea Flt4-CreERT<sup>2</sup>;Rosa26LSLlacZ, se cruzaron animales homocigotos para Flt4-CreERT<sup>2</sup> con animales homocigotos para Rosa26LSLlacZ, de manera que toda la descendencia era portadora de las dos modificaciones en hemicigosis. Una vez establecida la línea Flt4-CreERT<sup>2</sup>;Rosa26LSL se realizaron diversos protocolos de inducción de la actividad de Cre mediante la administración de tamoxifeno con el objetivo de optimizar las condiciones de activación de la recombinasa sin comprometer la vida del animal en distintos estadios del desarrollo pre y postnatal.

## 5.2.1 Inducción de la actividad de Cre durante el desarrollo embrionario.

Según lo descrito previamente, Flt4 comienza a expresarse en el embrión a día E8.5 en los plexos sanguíneos primarios. Por tanto, inicialmente se administró tamoxifeno por vía intraperitoneal a hembras gestantes de genotipo silvestre a E8.5. Estas hembras se habían cruzado con machos homocigotos para Flt4-CreERT<sup>2</sup> y Rosa26LSLlacZ de manera que todos los embriones de cada camada son portadores de estos dos alelos en heterocigosis. En primer lugar se hizo un análisis de dosis-respuesta administrando 2mg, 3mg o 5mg a estas hembras gestantes a E8.5 y analizando los embriones a día E9.5. Los embriones se tiñeron con X-Gal siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos (Apartado 21) para analizar la inducción de la recombinasa por detección de la expresión de LacZ.

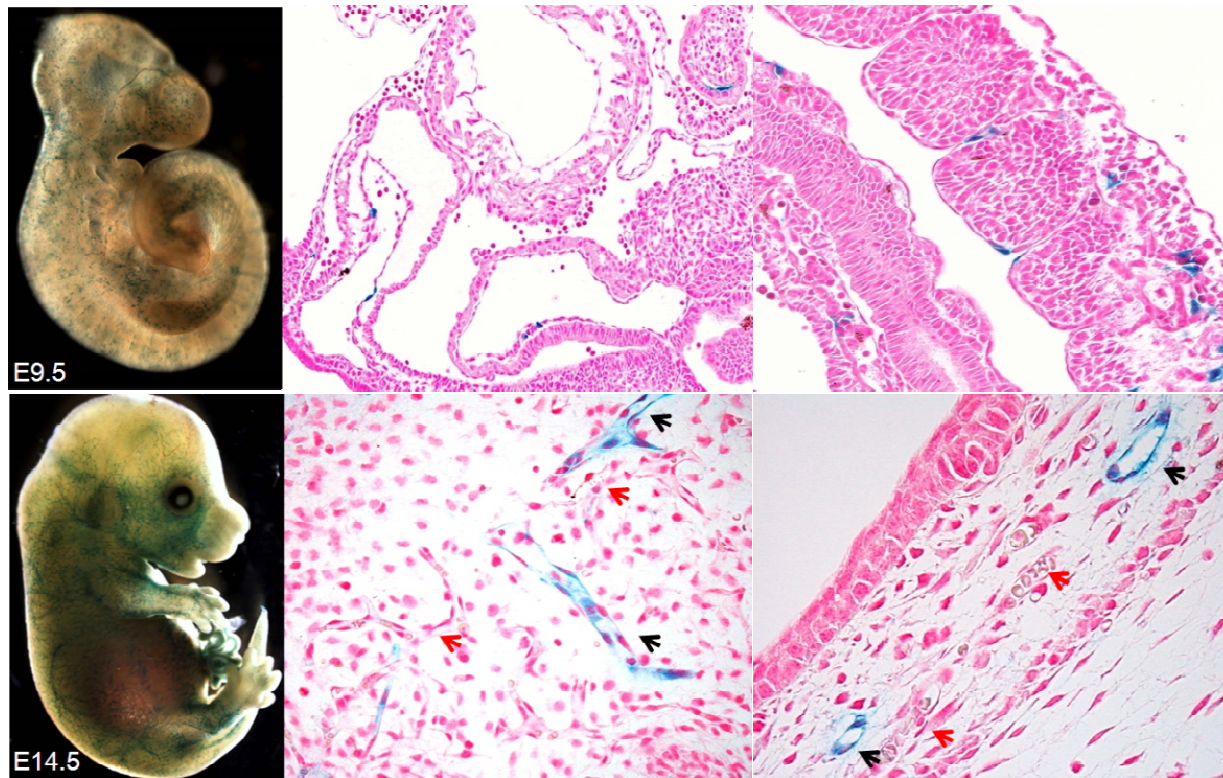
En el análisis dosis-respuesta, tras la tinción de los embriones con X-Gal, se obtuvo coloración azul a cada una de las dosis ensayadas y como era esperado, se produce un aumento en la eficiencia de la recombinación mediada por Cre a medida que aumenta la dosis de tamoxifeno administrada, indicando de esta manera, la existencia de un efecto dosis-respuesta (Figura 37). La tinción se localiza específicamente en los vasos sanguíneos primarios, coincidiendo con la localización de Flt4 en este estadio de desarrollo.



**Figura 37.** Efecto dosis-respuesta de la administración de tamoxifeno a hembras gestantes. Se administran 2, 3 y 5mg de tamoxifeno en una única inyección intraperitoneal a hembras gestantes a día E8.5, los embriones se extraen a día E9.5 y se tiñen con X-Gal. La tinción azul se localiza específicamente en los plexos sanguíneos.

Una vez optimizada la dosis de tamoxifeno que produce una mejor inducción de la recombinasa CreERT<sup>2</sup> (5mg) se procedió a comparar la inducción de CreERT<sup>2</sup> en estas condiciones y en dos momentos distintos del desarrollo embrionario, antes y después de que la expresión de Flt4 se haga específica de la vasculatura linfática. Se realizó un tratamiento con 5mg de tamoxifeno a día E8.5 y E13.5 de desarrollo embrionario y se extrajeron los embriones 24 horas después de cada tratamiento. Tras la tinción con X-Gal se pudo observar que, como era de esperar, a día E9.5 la tinción azul pertenece sobre todo a células endoteliales sanguíneas, ya que el sistema linfático aún no se ha desarrollado. Por el contrario, a día E14.5 la tinción se encuentra de forma mayoritaria en la vasculatura linfática (Figura 38). La expresión de CreERT<sup>2</sup>, por tanto, recapitula la expresión de Flt4 durante el desarrollo embrionario en los primeros estadios del desarrollo de la vasculatura linfática. El modelo por tanto, permite la realización de un seguimiento de la formación del sistema linfático y de la especificación del receptor a células endoteliales linfáticas en los distintos días de desarrollo de la vasculatura linfática.



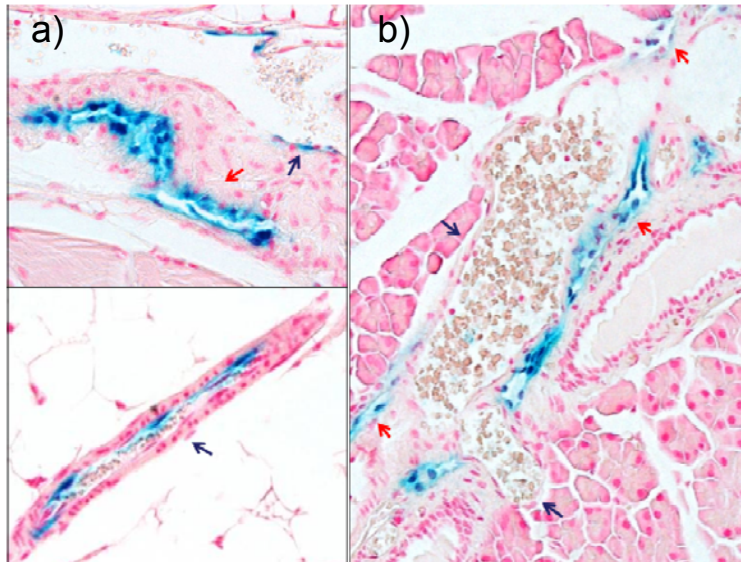


**Figura 38.** Tratamiento con 5mg de tamoxifeno a E8.5 y E13.5 de embriones heterocigotos para *Flt4-CreERT2* y *Rosa26LSLLacZ*. Se muestra el análisis de la tinción con X-Gal en los embriones 24h después del tratamiento. Imagen superior) *Whole mount* a E9.5 e histologías con NFR. Se observa la presencia de células azules formando parte de los primeros plexos sanguíneos del embrión. Imagen inferior) *Whole mount* a E14.5 e histologías con NFR. Los vasos linfáticos, señalados con flechas negras, presentan tinción azul, mientras que los sanguíneos, señalados con flechas rojas y que se identifican por su contenido en eritrocitos, no presentan ningún tipo de tinción.

Con el objetivo de analizar la posible letalidad embrionaria con dosis altas de tamoxifeno, se trataron hembras a distintos días de gestación con 3 y 5mg de tamoxifeno y se dejó que la gestación llegase a término. Debido a la naturaleza hormonal del tratamiento, las hembras tratadas con tamoxifeno no paren de manera natural y las crías se rescatan por cesárea a día E19.5. No se observaron problemas de letalidad embrionaria a las dosis y en los días ensayados, incluso en el día más temprano de tratamiento E8.5, y en la dosis más alta, la de 5mg. Por otra parte, no se detectó ningún tipo de tinción azul en los animales no tratados con tamoxifeno. Algunas de las hembras de estos tratamientos no estaban preñadas en el momento de la cesárea, pero no conocemos si se debe a un motivo de reabsorción o a que a pesar de haber presentado tapón vaginal, no estaban preñadas desde un principio.

La viabilidad de los embriones, incluso después del tratamiento con dosis altas de tamoxifeno, nos permitió analizar el destino de las células marcadas en diferentes estadíos de desarrollo embrionario en animales adultos, es decir, hacer un trazado de linajes celulares. Así, se administró a hembras gestantes a E8.5 y E13.5 una única dosis de 5mg de tamoxifeno intraperitoneal y se analizó el resultado a las 6 semanas de edad del animal. Los resultados muestran que cuando la inducción con tamoxifeno se realiza a día 8.5 la mayor parte de las células azules que se detectan en el animal adulto se encuentran

mayoritariamente formando parte de vasos sanguíneos, aunque es posible detectar algún vaso linfático teñido de azul (Figura 39). Cuando se realiza el análisis de la inducción a E13.5, que es cuando la vasculatura linfática ya está desarrollada, prácticamente toda la tinción azul forma parte de la vasculatura linfática y las células azules detectadas en vasos sanguíneos son minoritarias (Figura 39).



**Figura 39:** Ensayo de trazado de linajes.

a) Inducción con 5mg de TAM a E8.5 y análisis a las 6 semanas de edad del animal. Se observa tinción en el endotelio de los vasos sanguíneos, que se reconocen por su contenido en eritrocitos (flechas negras) y en algún baso linfático. (Flechas rojas) b) Inducción con 5mg de TAM a E13.5 y análisis a las 6 semanas. La tinción azul se encuentra prácticamente restringida al sistema linfático

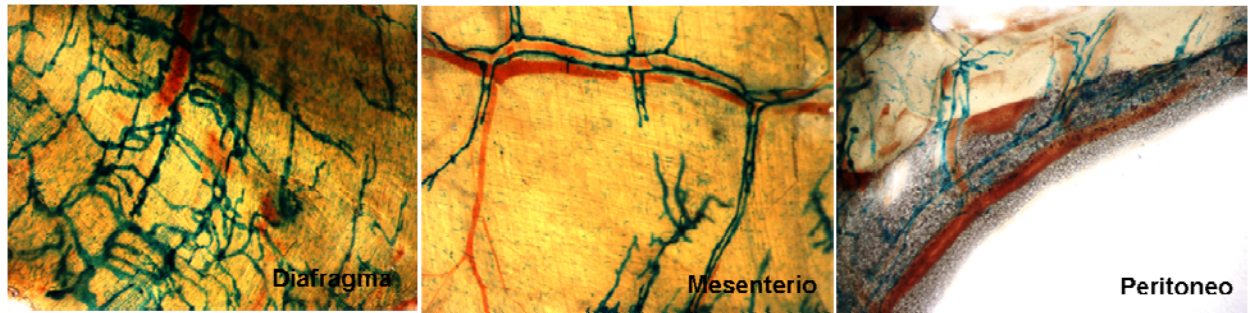
La elección de las dosis para realizar futuros tratamientos se eligen en función del tiempo que se pretenda de actuación para la recombinasa, teniendo en cuenta que 3mg de tamoxifeno ejercen su función durante un periodo de tiempo inferior a 24 horas, y 5mg lo hacen durante un periodo inferior a 2,5 días (Srinivasan et al 2007).

### 5.2.2 Inducción de la actividad de Cre durante el desarrollo perinatal

El siguiente objetivo fue optimizar la inducción de la recombinasa Cre en nuestro modelo en el periodo perinatal, con el objetivo último de poder inducir modificaciones genéticas en el sistema linfático inmediatamente después del nacimiento. Para ello se siguió un protocolo de administración oral de tamoxifeno en la dieta. Desde el día del parto (P0) y hasta el día del destete de las crías (P21), se mantuvo a la madre con dieta de tamoxifeno (0,4mg TAM/grm de pienso, Harlan Labotaries). De esta forma las crías, todas ellas portadoras de los alelos Flt4-CreERT2 y Rosa26LSLlacZ en heterocigosis, recibieron el tratamiento a través de la leche materna desde el momento del nacimiento y hasta el momento del destete.

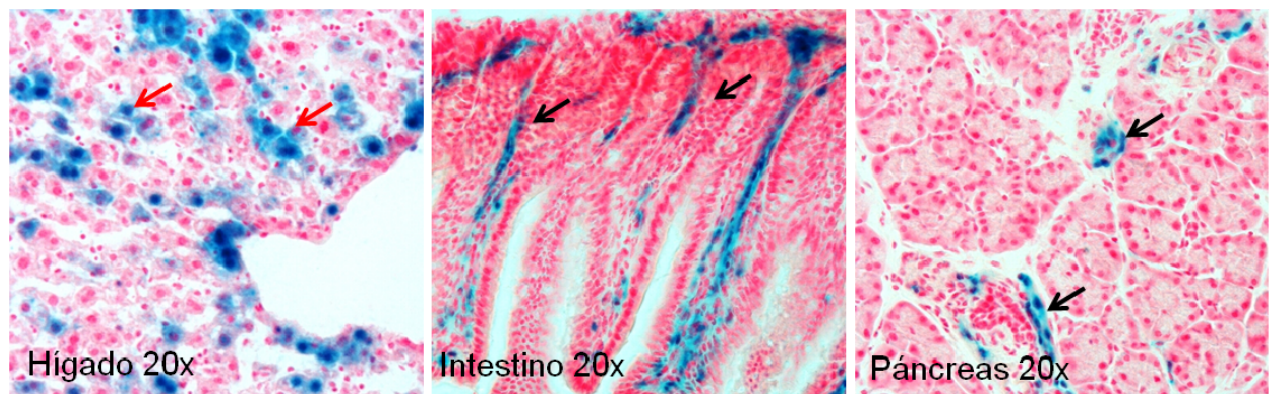
A los 21-25 días de edad las crías se sacrificaron e inicialmente se hizo una tinción por la técnica de *whole mount* con X-Gal (Apartado 21 de materiales y métodos) de varios órganos que presentan una alta densidad de vasos linfáticos como diafragma, mesenterio y peritoneo. Como se puede observar en la figura 40, la vasculatura linfática aparece teñida de color azul mientras que la sanguínea, que se distingue por su contenido en eritrocitos, no presenta tinción.





**Figura 40:** Tinción *whole mount* para X-Gal de diafragma, mesenterio y peritoneo de animales heterocigotos Flt4-CreERT<sup>2</sup>; Rosa26LSLlacZ analizados a los 21 días de edad tras la administración de un tratamiento de tamoxifeno a través de la leche materna. Los vasos linfáticos se encuentran teñidos de un intenso color azul.

Se realizó también un estudio histológico para verificar la localización de la tinción azul en aquellos lugares en los que haya expresión de Flt4. El estudio de hígado, intestino y páncreas entre otros, muestra tinción azul en el endotelio linfático y en el caso del hígado también en macrófagos en los sinusoides hepáticos y en algunos hepatocitos. Más de un 80% de los vasos linfáticos aparecen teñidos en estos órganos, lo que demuestra una alta eficiencia de la inducción de Cre en estas condiciones (Figura 41) No se detectó ningún tipo de tinción azul en los animales no tratados con Tamoxifeno.



**Figura 41:** Análisis histológico de animales heterocigotos para Flt4-CreERT<sup>2</sup> y Rosa26LSLlacZ que recibieron TAM a través de la leche materna. Se muestran imágenes de la tinción con X-Gal en cortes de criostato de hígado, intestino y pulmón. La contratinción se realizó con NFR. La tinción azul está restringida a los vasos linfáticos (flechas negras) y se observa también en el hígado, en sinusoides hepáticos y algún hepatocito (flechas rojas).

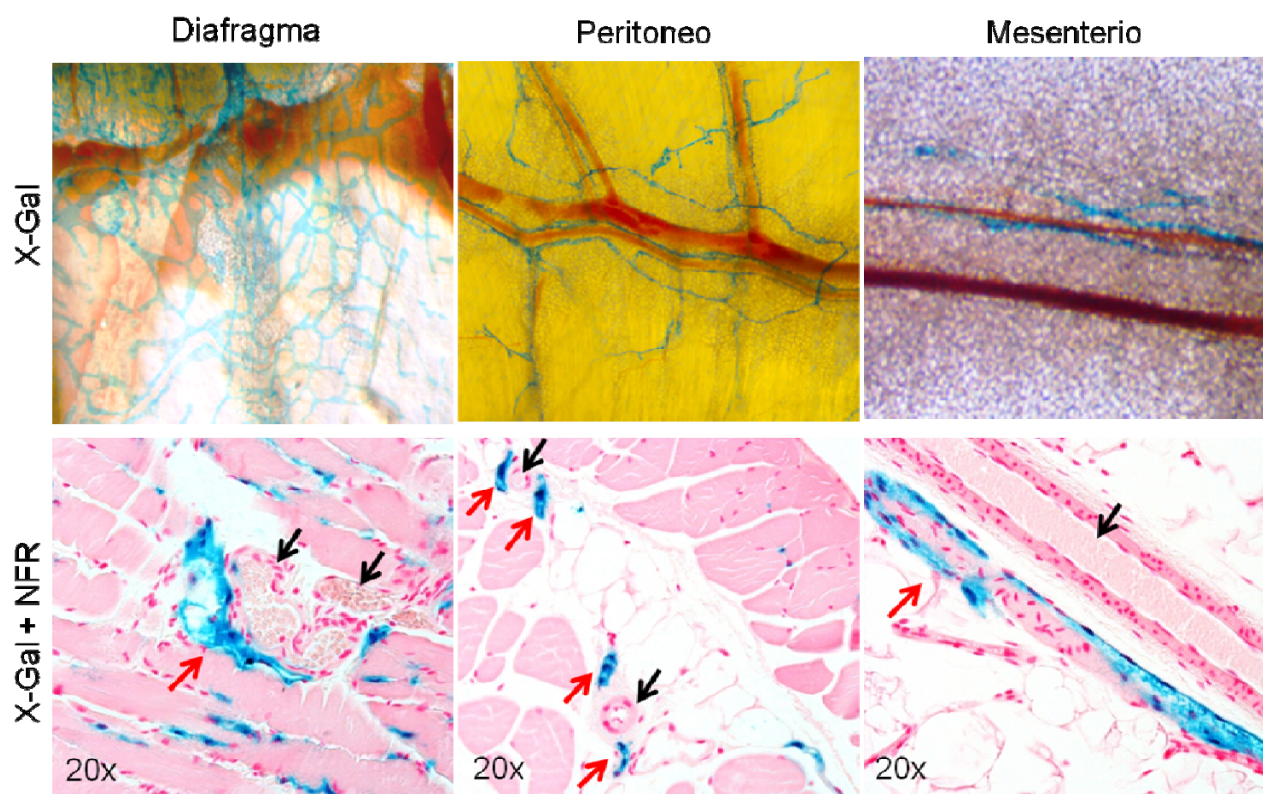
Teniendo en cuenta estos resultados, podemos decir que la inducción de Flt4-CreERT<sup>2</sup> por administración oral de tamoxifeno a través de la leche es muy eficiente durante de desarrollo perinatal. De nuevo se observó una tinción específica en el endotelio linfático mientras que el sanguíneo no se tiñe.



### 5.2.3 Inducción de la actividad de Cre en el animal adulto

Para completar la caracterización del modelo, se analizó la eficiencia de la inducción de la actividad de la recombinasa en animales adultos ( $\geq 4$  semanas de edad). En este grupo se ensayaron distintos protocolos de administración de tamoxifeno que se diferencian en función de la duración del tratamiento, así como en la vía de administración (oral o intraperitoneal).

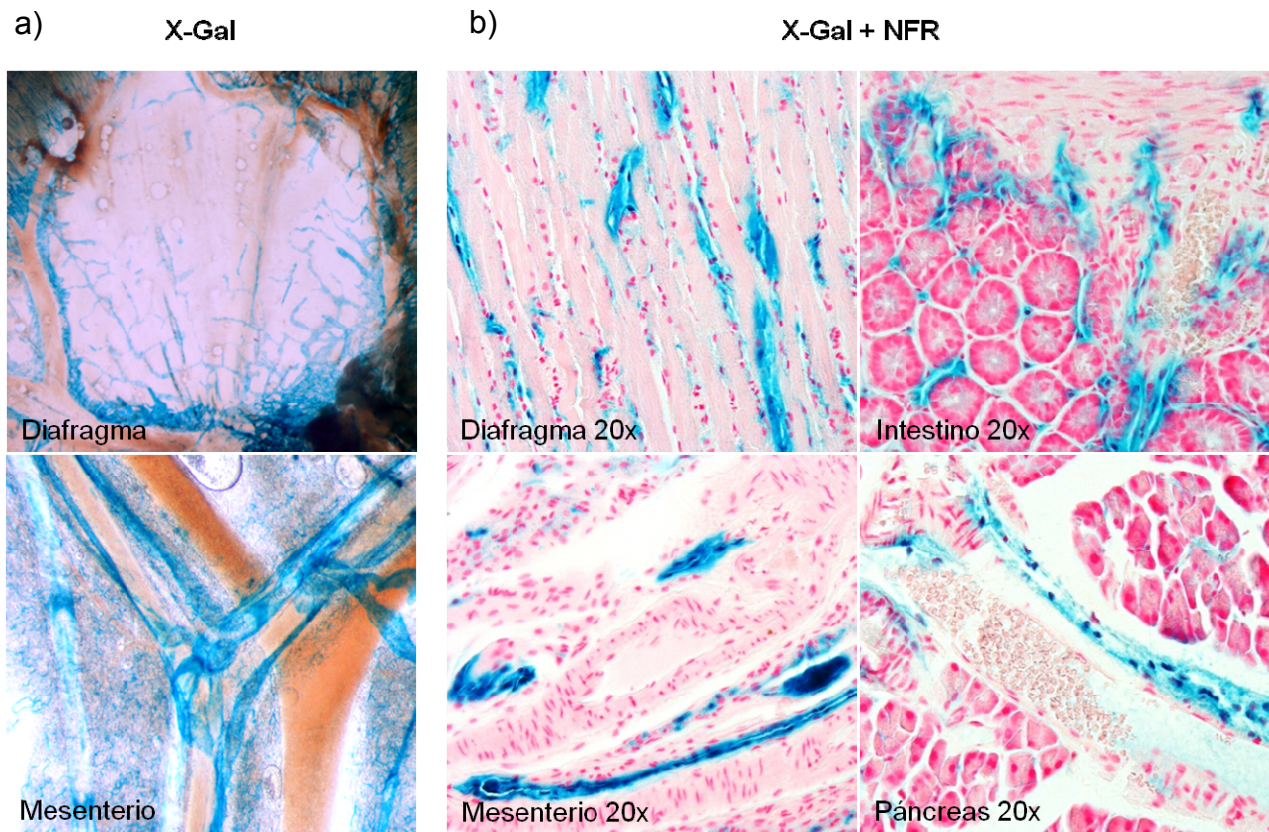
En primer lugar, un grupo de animales de 4 semanas de edad y heterocigotos para los dos alelos Flt4-CreERT<sup>2</sup> y Rosa26LSLlacZ, fue tratado con dieta de tamoxifeno durante 5 semanas. El análisis de la inducción se realizó dos días después de completar el tratamiento. Los tejidos fueron procesados para su análisis mediante tinción con X-Gal. En los resultados obtenidos para todos los tejidos analizados se observa una intensa coloración azul en el endotelio de los vasos linfáticos tras la tinción con X-Gal, indicando una buena eficiencia de activación de CreERT<sup>2</sup> con este tratamiento (Figura 42). Con dietas de menos de 5 semanas, la inducción era claramente menos eficiente y con dietas de más de 5 semanas de duración no se obtuvo una mejora notable en la eficiencia de la escisión.



**Figura 42:** Dieta de tamoxifeno durante 5 semanas en animales Flt4-CreERT<sup>2</sup>; Rosa26LSLlacZ de 4 semanas de edad. Análisis de la tinción con X-Gal de diafragma, peritoneo y mesenterio tanto en *whole mount* (fotos superiores) como en secciones de parafina de diafragma, peritoneo y mesenterio (fotos inferiores). Se observa una buena eficiencia en la inducción. Además, la coloración azul se encuentra restringida al endotelio linfático (señalado por flechas rojas). Los vasos sanguíneos se identifican por su contenido en eritrocitos (flechas negras).

## Resultados

Por otro lado, para comparar la eficiencia de escisión en función de la vía de administración de tamoxifeno, a otro grupo de animales del mismo genotipo y de 10 semanas de edad se les administró tamoxifeno por vía intraperitoneal durante 5 días a una dosis de 4mg TAM/día. El estudio histológico de los tejidos se llevó a cabo dos días después de la finalización del tratamiento. En éste caso, tras la tinción con X-Gal, se obtuvo una eficiencia similar o incluso algo superior a la dieta de 5 semanas, pero en un tiempo mucho más reducido (Figura 43).



**Figura 43:** Administración de tamoxifeno intraperitoneal 4mg día/5 días a animales adultos. a) Análisis de la tinción con X-Gal de diafragma y mesenterio en *whole mount*. b) Secciones de parafina de diafragma, mesenterio, intestino y páncreas contrateñidas con NFR. Se observa una buena eficiencia en la inducción y que la coloración azul está restringida al endotelio linfático.

Al contrario que los animales que recibieron la dieta con tamoxifeno, que presentaban un aspecto normal a la finalización del tratamiento, los animales que recibieron 4mg/día durante 5 días de forma intraperitoneal mostraban un aspecto enfermizo en el momento en el que finalizó el tratamiento. Por este motivo, a pesar de generar una buena inducción de la actividad de CreERT<sup>2</sup>, no se trata de un tratamiento adecuado más que para un análisis inmediato. Habría que reducir la dosis para estudios a largo plazo con esta vía de administración.

En ensayos posteriores, la elección del tipo de la vía de administración de tamoxifeno en animales adultos se hará en función de que el proceso que se pretenda estudiar sea más o menos limitado en el tiempo.

## 6. Aplicaciones del modelo Flt4-CreERT<sup>2</sup>; Rosa26LSLlacZ

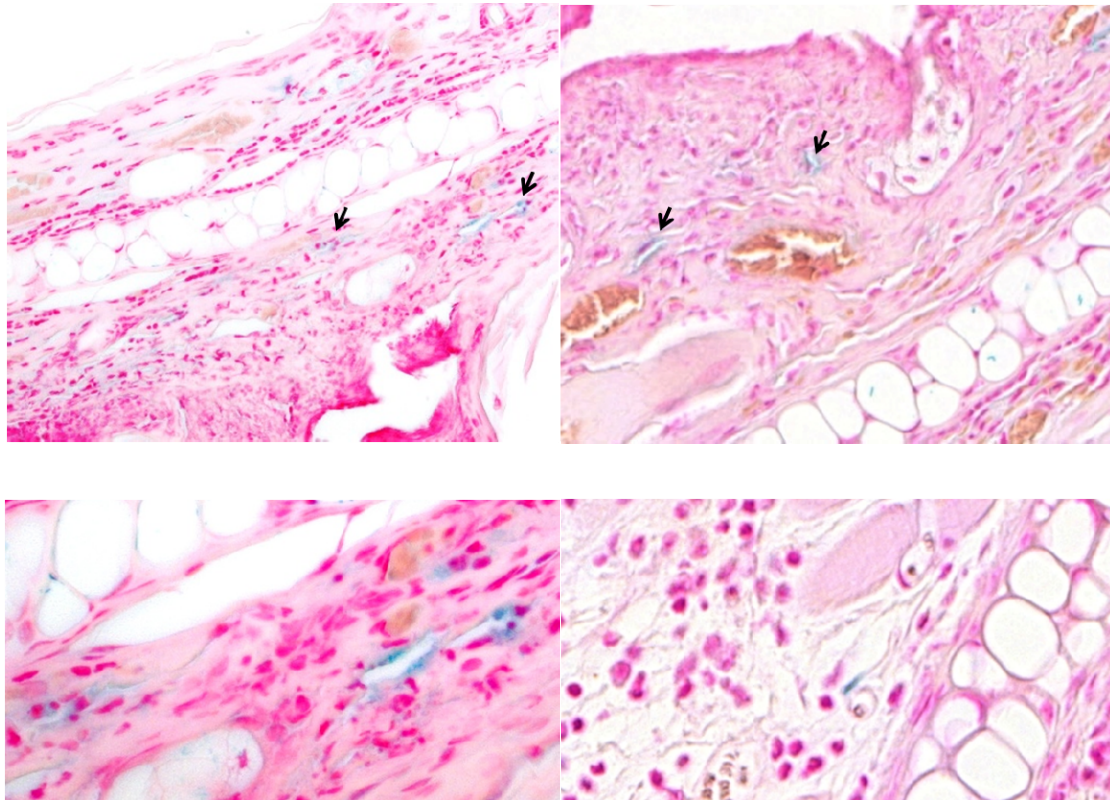
### 6.1 Contribución de precursores endoteliales a la formación de vasos linfáticos

Como se ha comentado en el apartado 3.1.4 de estos resultados y en la introducción, existe cierta controversia acerca de la contribución de células progenitoras endoteliales circulantes a la vasculatura linfática durante la formación de nuevos capilares linfáticos asociada a procesos patológicos como tumores o inflamación. Por otro lado, varios estudios han demostrado que durante la gestación existen células progenitoras endoteliales fetales que se transmiten del feto a la madre y que en ciertas condiciones asociadas a procesos patológicos o de regeneración tisular son capaces de incorporarse para formar parte de endotelios sanguíneos en vasos de nueva formación (Nguyen et al. 2007; Kerjaschki et al, 2006). No se ha descrito un estudio paralelo en vasos linfáticos.

Con el modelo Flt4-EGFPluc se comprobó que era posible monitorizar la transferencia de células progenitoras que expresan VEGFR3 del embrión a la madre y su reclutamiento al lugar dónde se induce un proceso inflamatorio. Sin embargo este modelo no permitía concluir si estas células se incorporan finalmente a los vasos linfáticos o cual es su destino final (apartado 3.1.4 de resultados). Para responder esta cuestión utilizamos el modelo Flt4-CreERT<sup>2</sup> y Rosa26LSLlacZ. Se cruzaron machos homocigotos para la construcción Flt4CreERT<sup>2</sup>; Rosa26LSLlacZ con hembras de genotipo silvestre. De ésta manera todas las crías serán portadoras la construcción Flt4-CreERT<sup>2</sup> y de Rosa26LSLlacZ en heterocigosis. Durante la gestación se induce en la madre un proceso de hipersensibilidad por contacto mediante la administración de oxazolona tópica 2% en las orejas para inducir un proceso de inflamación y de generación de nuevos vasos linfáticos (apartado 3.1.2 de resultados). Al mismo tiempo del tratamiento con oxazolona se administró a las madres gestantes una única dosis de 5mg de tamoxifeno intraperitoneal a día E13.5 para inducir CreERT<sup>2</sup> en células fetales que expresan Flt4. En el momento en el que la gestación llegó a término (día E19.5) las hembras se sacrificaron, se tiñeron las orejas con X-Gal y se estudió mediante cortes histológicos la presencia de células azules, que sólo pueden proceder del embrión y son portadoras de la construcción Flt4-CreERT<sup>2</sup>; Rosa26LSLlacZ.

En los cortes histológicos es posible detectar la presencia de células con coloración azul formando parte de endotelios linfáticos (Figura 44). Esto indica no sólo que ha habido paso de células progenitoras del embrión a la madre, sino que estas células son capaces de incorporarse para formar vasos linfáticos en procesos patológicos.





**Figura 44:** Incorporación de células progenitoras fetales a los vasos linfáticos de la madre. Análisis histológico mediante tinción con X-Gal y NFR de las orejas tratadas con oxazolona. Se detecta la presencia de células con coloración azul formando parte del endotelio de algunos vasos linfáticos (flechas negras).

### 6.2 Inactivación de c-Met específicamente en endotelio linfático

Uno de las aplicaciones más importantes del modelo Flt4-CreERT<sup>2</sup> y para lo que se ha diseñado fundamentalmente es para generar modelos condicionales específicos de endotelio linfático con el fin de estudiar el funcionamiento y la regulación del sistema linfático a nivel molecular tanto en situaciones fisiológicas como en procesos patológicos tales como inflamación, cáncer y desarrollo de metástasis. Dada la potencial relevancia de la señalización mediada por HGF/c-Met en el endotelio linfático, tal y como se describe en el apartado 5 de la introducción, decidimos inicialmente generar un modelo knockout de c-Met específicamente en células endoteliales linfáticas en el que pudiéramos evaluar directamente la relevancia de c-Met en el endotelio, sin intervención de otros posibles fenotipos como ocurre en el knockout constitutivo, tanto durante el desarrollo del sistema linfático como en el adulto.

Con este objetivo, se establecieron cruces entre ratones Flt4-CreERT<sup>2</sup>; Rosa26LSLlacZ y ratones portadores del alelo knockout condicional de c-Met (c-Met<sup>fl/fl</sup>) (Huh et al. 2004). En ratones c-Met<sup>fl/fl</sup> portadores del alelo Flt4-CreERT<sup>2</sup> la administración de tamoxifeno inducirá la inactivación específica de c-Met en células que expresen VEGFR3, es decir, fundamentalmente en células endoteliales linfáticas, lo que hará posible estudiar el papel que juega c-Met en este tipo celular de un modo autónomo, independiente de los fenotipos causados por la inactivación simultánea de c-Met en otros tipos celulares. La presencia del alelo Rosa26LSLlacZ permitirá monitorizar el nivel de inducción de CreERT<sup>2</sup> en el

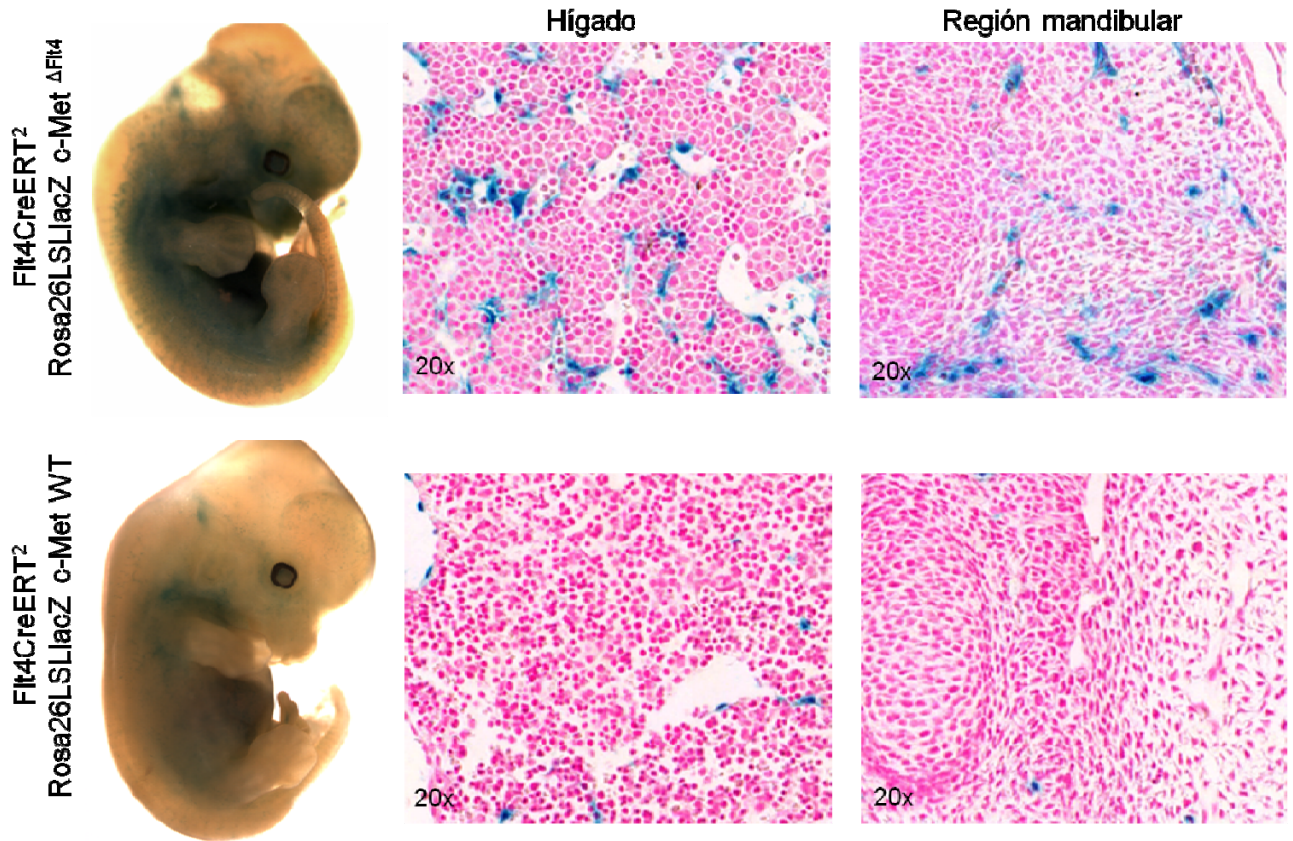
modelo, en los distintos ensayos de activación con tamoxifeno. Los cruces se establecieron entre animales homocigotos para Flt4-CreERT<sup>2</sup> y para Rosa26LSLlacZ y animales c-Metfl/fl. Una vez establecida la línea, los estudios que se describen a continuación se realizaron con animales c-Metfl/fl, homocigotos o heterocigotos para Flt4-CreERT<sup>2</sup> y para Rosa26LSLlacZ, ya que una sola copia de cada uno de estos dos alelos es suficiente para el análisis. Como control en los distintos ensayos se utilizaron animales de genotipo silvestre para c-Met y homocigotos o heterocigotos para Flt4-CreERT<sup>2</sup> y Rosa26LSLlacZ.

### 6.2.1 Inactivación de c-Met en el endotelio durante el desarrollo embrionario

Ratones knockout para HGF y ratones knockout para c-Met presentan letalidad alrededor del día E16.5 del desarrollo embrionario causada por múltiples alteraciones en distintos órganos (Schmidt et al. 1995, Maina et al 2001), sin embargo no hay datos de cómo afecta la eliminación de ninguno de estos genes al desarrollo o función de las células endoteliales in vivo.

El primer objetivo que nos planteamos fue comprobar si la inactivación de c-Met en momentos tempranos del desarrollo embrionario afectaba al desarrollo del sistema vascular, tanto sanguíneo como linfático. Para ello se establecieron cruces entre hembras homocigotas para c-Met<sup>fl/fl</sup>, Flt4-CreERT<sup>2</sup> y Rosa26LSLlacZ con machos c-Metfl/fl y heterocigotos para los otros dos alelos de modo que todos los embriones de cada camada resultasen homocigotos para c-Met y homocigotos o heterocigotos para Flt4-CreERT<sup>2</sup> y para Rosa26LSLlacZ. Inicialmente se indujo la activación de Cre, mediante administración intraperitoneal de 5mg de tamoxifeno a hembras gestantes a día E10.5 de desarrollo embrionario, cuando todavía no se ha desarrollado el endotelio linfático y Flt4 se expresa en endotelio sanguíneo. Animales knockout de c-Met en el endotelio, obtenidos por inducción de Flt4CreERT<sup>2</sup> se denominarán de ahora en adelante c-Met<sup>ΔFlt4</sup>. En este primer estudio, después de la inducción a E10.5, los embriones se analizaron a día E12.5 mediante tinción con X-Gal en *whole mount* para intentar detectar posibles anomalías en el desarrollo del sistema vascular.

En primer lugar se observó que los embriones c-Met<sup>ΔFlt4</sup> inducidos a E10.5 y extraídos a E12.5 no presentaban alteraciones notables en el desarrollo, de forma que macroscópicamente eran indistinguibles de embriones Flt4-CreERT<sup>2</sup>; Rosa26LSLlacZ y WT para c-Met sometidos al mismo protocolo de inducción con tamoxifeno. Sin embargo, tras la tinción con X-Gal se observó que en embriones c-Met<sup>ΔFlt4</sup> había una coloración azul mucho más generalizada que en los embriones c-Met silvestres sometidos al mismo tratamiento (Figura 45). La tinción seguía siendo específica de estructuras vasculares, pero muchos más vasos o capilares con aspecto de vasos sanguíneos, no linfáticos, se teñían azules en ausencia de c-Met. Esta observación se pudo verificar también a nivel de cortes histológicos de los embriones, donde se ve lo mismo: mucha más tinción azul en vasos en ausencia de c-Met (Figura 45).



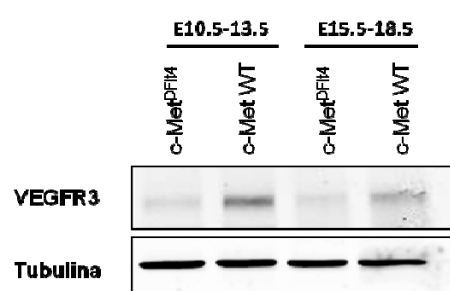
**Figura 45:** Tinción con X-Gal de embriones tratados con 5mg TAM a E10.5 y sacrificados a E12.5. Se muestra la tinción *whole mount* y la histología correspondiente del hígado y región mandibular de los embriones en los que se ha inactivado *c-Met* (imagen superior) y sus respectivos controles (imagen inferior). Se aprecia un incremento de la tinción con X-Gal en los embriones *c-Met* KO.

A continuación, nos planteamos si la inactivación de *c-Met* específicamente en el endotelio linfático, en un momento más tardío del desarrollo, produciría un fenotipo similar. Para ello los cruces se establecieron de la misma forma que en el ensayo anterior, y se administró 5mg de tamoxifeno mediante inyección intraperitoneal a hembras gestantes a día E13.5 en que la expresión de *Flt4*, y por tanto de *CreERT<sup>2</sup>*, es específica de endotelio linfático, y los embriones se estudiaron mediante tinción de X-Gal a día E15.5. El resultado fue similar en este caso. Los vasos linfáticos de la piel que aparecen muy claramente teñidos de azul en embriones *Flt4-CreERT<sup>2</sup>; Rosa26LSLlacZ; c-MetWT* tratados de la misma forma, prácticamente no aparecían teñidos en embriones *c-Met<sup>ΔFlt4</sup>*, mientras que en los órganos internos, la tinción con X-Gal es más generalizada y más extensa en embriones en los que se ha inactivado *c-Met* específicamente en el endotelio linfático. Además, al contrario de lo que ocurre en embriones *c-Met* WT, se observan vasos sanguíneos que aparecen teñidos con X-Gal en los embriones *c-Met<sup>ΔFlt4</sup>*. Sin embargo, y como ocurre cuando se inactiva *c-Met* a día E10.5, en este caso los embriones tampoco presentaban alteraciones macroscópicas notables.

El aumento en el número de vasos teñidos con X-Gal, con morfología más parecida a la de vasos sanguíneos que a la de linfáticos, en embriones *c-Met<sup>ΔFlt4</sup>*, sugería que la inactivación de *c-Met* podría resultar en un aumento en los niveles de expresión de *Flt4* en el endotelio. Para comprobarlo se comparó por *western blot* los niveles de VEGFR3 en embriones WT para *c-Met* y en embriones *c-Met<sup>ΔFlt4</sup>* en los



que la inducción de Flt4-CreERT<sup>2</sup> se hizo a E10.5 ó a E15.5. En ambos casos la inducción de Flt4-CreERT<sup>2</sup> se hizo durante tres días, es decir los embriones se analizaron a E13.5 y E18.5 respectivamente. En la figura 46 se muestra que, al contrario de lo que cabría esperar, con el mismo tratamiento de tamoxifeno los embriones c-Met<sup>ΔFlt4</sup> presentan niveles de expresión de VEGFR3 inferiores a los embriones de genotipo silvestre para c-Met tanto a E10.5 como a E15.5. Por lo tanto el aumento en el número de vasos teñidos no se correlaciona con un aumento en los niveles de expresión de Flt4 y de CreERT<sup>2</sup>, en los embriones c-Met<sup>ΔFlt4</sup>, sino al contrario, la inactivación de c-Met en el endotelio, al menos durante el desarrollo embrionario, conduce a una disminución en la expresión de VEGFR3.



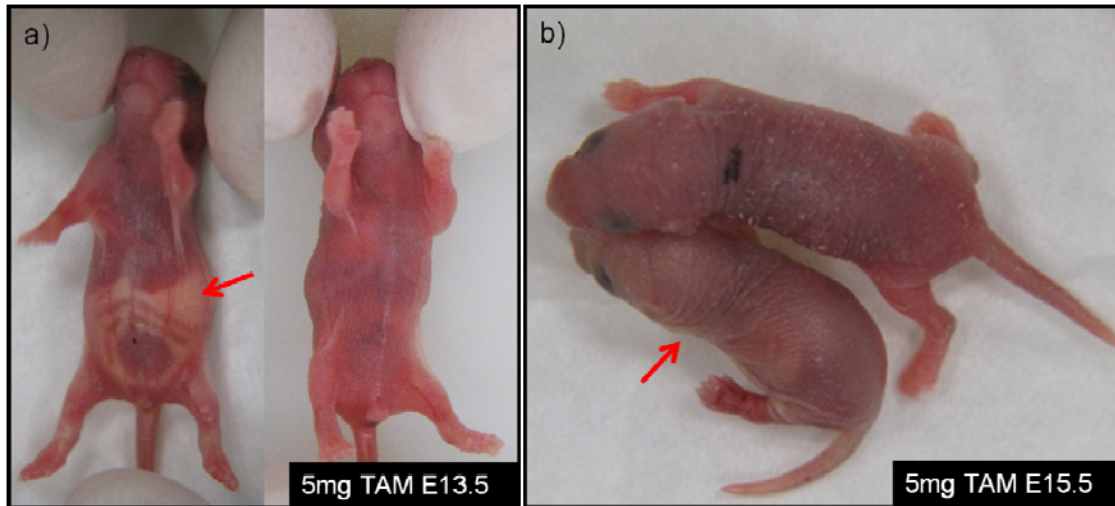
**Figura 46:** Análisis de la expresión de VEGFR3 mediante *western blot* en los animales en lo que se ha inducido la inactivación de c-Met y sus respectivos controles. El análisis se realiza tres días después del tratamiento de hembras gestantes con 5mg de Tamoxifeno a día E10.5 y a día E15.5. (Antes y después de la restricción de VEGFR3 a endotelio linfático). Los niveles de expresión son superiores en los animales de genotipo silvestre para c-Met tanto en los embriones tratados a E10.5 como en los tratados a E15.5.

Como los embriones analizados después de 2 ó 3 días de inducción con tamoxifeno no presentaban alteraciones macroscópicas notables, a pesar de mostrar una tinción más generalizada de X-Gal en vasos se decidió, después de la inducción, dejar que los embriones se desarrollaran a término y recuperar las crías mediante cesárea a día E19.5 con objeto de comprobar si aparecían lesiones macroscópicas apreciables en las crías que indicaran defectos en el funcionamiento o el desarrollo de la vasculatura linfática. En este caso se administró tamoxifeno (como en el caso anterior, una dosis única de 5 mg por vía intraperitoneal) a hembras gestantes a día E13.5 o a día E15.5 para inducir la inactivación de c-Met específicamente en el endotelio linfático alrededor del momento en que se produce letalidad embrionaria en ratones knockout de c-Met (E16.5). Las crías recuperadas a E19.5 por cesárea se pusieron en adopción con madres nodrizas.

De las crías c-Met<sup>ΔFlt4</sup> inducidas a E13.5 o E15.5 aproximadamente un 80% era canibalizada o moría durante los 10 primeros días de vida. Esto no se observa en el caso de camadas de fenotipo silvestre en las que el nivel de supervivencia en adopción es del orden del 90%. En muchos casos las madres canibalizaban las camadas durante las primeras 24 horas. Las mayoría de las crías supervivientes presentaban un tamaño inferior al de un animal silvestre de la misma edad (Figura 47b).

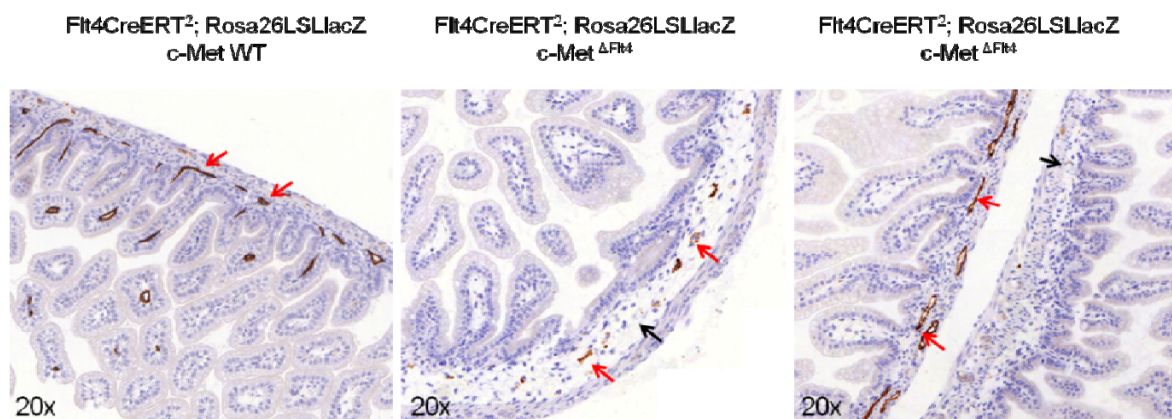


La observación macroscópica de las crías  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Flt4}}$  que sobreviven durante los primeros días de adopción puso de manifiesto que muchas de ellas presentaban una ascitis quilosa evidente, que se caracteriza por la acumulación en el abdomen de un líquido blanquecino (Figura 47a). Este fenotipo es característico de anomalías en el sistema linfático (Fruman et al. 2000).



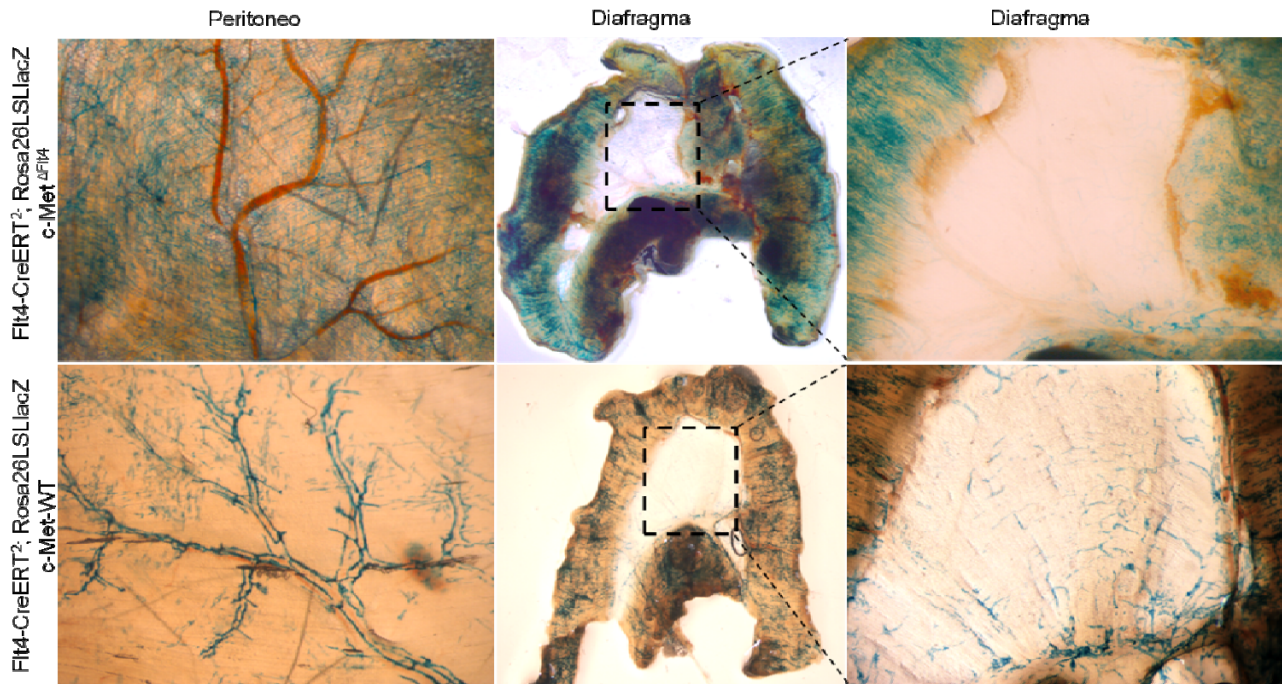
**Figura 47:** Crías recuperadas por cesárea del tratamiento de madres gestantes a E13.5 y E15.5 con 5mg de Tamoxifeno analizadas a P1. a) Cría pertenecientes al tratamiento a E13.5  $c\text{-Metflox}$  (izquierda). La cría de la derecha se trata de una cría control  $c\text{-MetWT}$ . En la cría  $c\text{-Metflox}$  se evidencia la presencia de ascitis quilosa que se señala con una flecha roja, mientras que la cría control presenta un aspecto normal. b) Tratamiento E15.5. La punta de flecha negra señala la cría correspondiente a este tratamiento, la otra es una cría control de la misma edad.

El estudio histopatológico del aparato digestivo de las crías que mostraban ascitis quilosa mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-Lyve1, puso de manifiesto la ausencia de vasos linfáticos detectables con Lyve-1 en abundantes zonas localizadas del intestino de estos animales. La ausencia de vasos linfáticos se correlacionaba con la presencia de edema en estas zonas (Figura 48). Esto explicaría la presencia de ascitis en estos animales. Este resultado permite concluir que la expresión de  $c\text{-Met}$  en el endotelio linfático es esencial para el desarrollo normal del sistema linfático, al menos en el aparato digestivo.



**Figura 48:** Análisis histológico del tubo digestivo de los animales tratados con tamoxifeno a E13.5. Se muestran inmunohistoquímicas frente a Lyve1 de un animal de genotipo silvestre para  $c\text{-Met}$  y del animal  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Flt4}}$  que presentaba ascitis quilosa. Se observa la presencia de edema (flechas negras) y una reducción en el número de vasos linfáticos presentes.

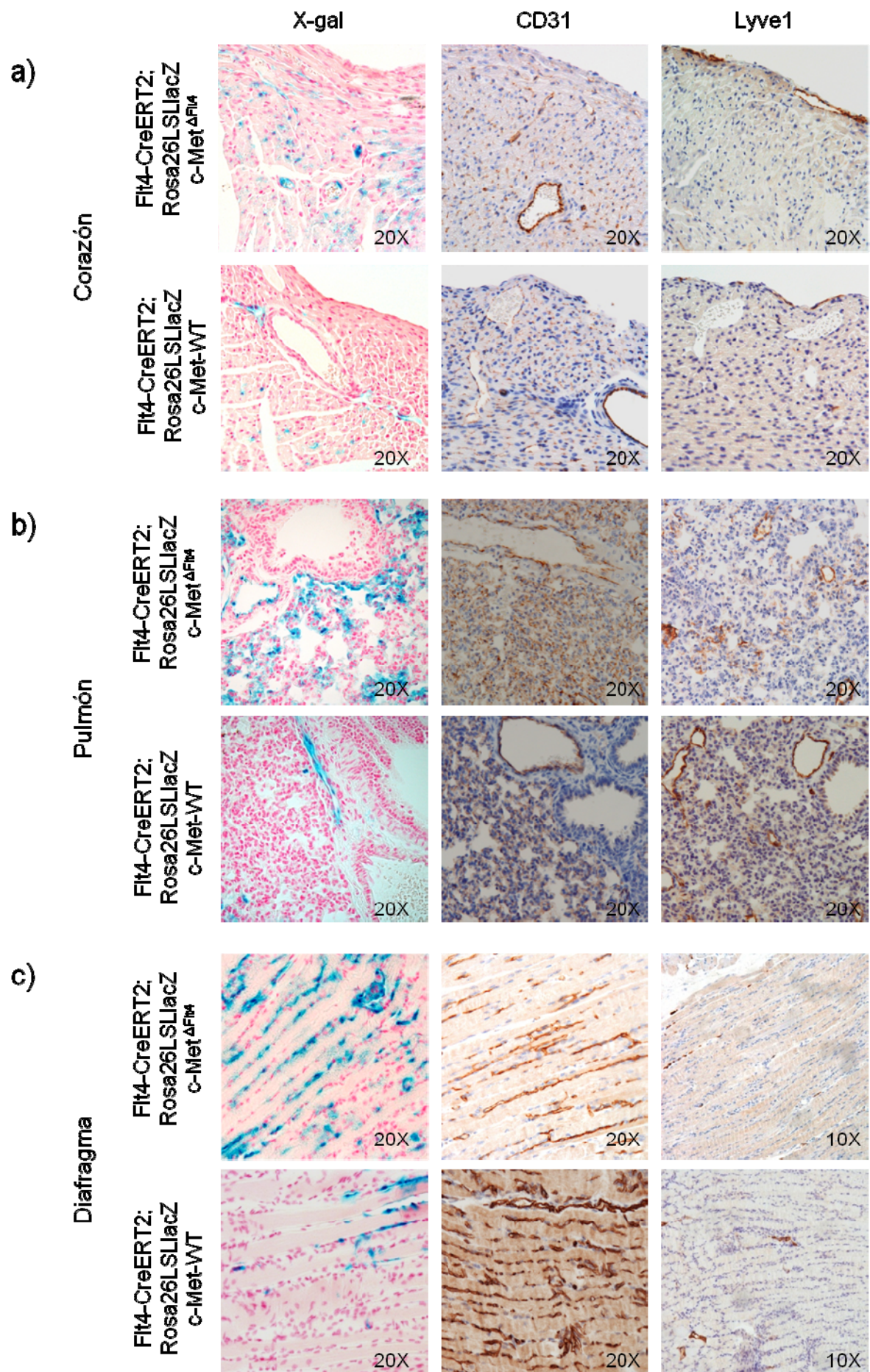
Pero además las crías analizadas, al igual que ocurría en embriones  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Flt4}}$ , presentan un patrón de tinción con X-Gal diferente al que se obtiene en los animales control (silvestres para  $c\text{-Met}$ ) en prácticamente todos los órganos analizados. En primer lugar, en órganos como diafragma y peritoneo no aparecen o aparecen muchos menos vasos linfáticos teñidos con X-Gal que en los animales control. Además, en estos órganos se observa un incremento muy notable de tinción azul en estructuras vasculares que no se corresponde con el patrón de tinción de la vasculatura linfática (Figura 49).



**Figura 49:** Tinción X-Gal *whole mount* de peritoneo y diafragma para los animales  $\text{Flt4-CreERT}^2$ ;  $\text{Rosa26LSLlacZ}$ ;  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Flt4}}$  y sus respectivos controles que fueron tratados con 5mg de TAM durante el desarrollo embrionario (E13.5). Se observa un cambio en el patrón de tinción con X-Gal entre los dos grupos de animales

Para estudiar este patrón de tinción con más detalle, se hicieron cortes histológicos de diferentes órganos teñidos con X-Gal que se contratiñeron con NFR. Este análisis confirma que los animales en los que se ha inactivado  $c\text{-Met}$  presentan un patrón de tinción con X-Gal diferente al de sus respectivos controles WT para  $c\text{-Met}$  (Figura 50). En general, hay más tinción azul en todos los órganos analizados de animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Flt4}}$ , aunque las diferencias con los animales control varían de unos órganos a otros. Por ejemplo, esta diferencia es más acusada en algunos tejidos como diafragma y pulmón. Además es interesante destacar que los vasos sanguíneos presentan tinción azul en las crías  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Flt4}}$ , algo que no se observa en animales control (WT para  $c\text{-Met}$ ) cuando se induce  $\text{Flt4-CreERT}^2$  en embriones después de E13.5.

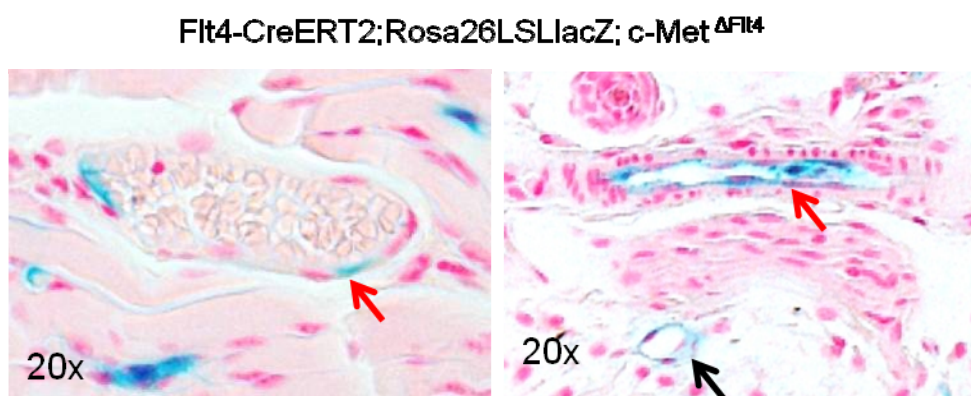




**Figura 50:** Estudio histológico de animales con 12 días de edad en los que se ha inactivado c-Met durante el desarrollo embrionario (E13.5) y sus respectivos controles. Histología para X-Gal, Cd31 y Lyve de cortes de parafina de a) corazón, b) pulmón y c) diafragma. El patrón de tinción con X-Gal en los distintos tejidos presenta mayor similitud con el patrón de tinción con CD31 que con Lyve1.

Por otro lado, el análisis por inmunohistoquímica con anticuerpos frente a Lyve1 revela que no hay grandes diferencias en la densidad de vasos linfáticos positivos para Lyve1 en los diferentes órganos, aunque sí se observan diferencias en su calibre (figura 50)

En general, parece que los vasos linfáticos ya establecidos se mantienen cuando se inactiva c-Met específicamente en el endotelio linfático, ya que la tinción con Lyve-1 no revela diferencias notables en la densidad de los vasos linfáticos en diferentes órganos. Pero algunos de estos vasos linfáticos no se tiñen con X-Gal, lo que sugiere que la eliminación de c-Met en el endotelio linfático conduce a una disminución en los niveles de expresión de VEGFR3 y por tanto de CreERT<sup>2</sup> en los vasos linfáticos. Sin embargo, la inactivación de c-Met da lugar a la aparición de un mayor número de vasos azules que no mantienen la expresión de marcadores linfáticos (por una parte hay menos expresión de VEGFR3 en los tejidos y estos nuevos vasos son negativos para Lyve1), pero que parece que pueden presentar marcadores sanguíneos como CD31 (Figura 50).



**Figura 51:** En los animales c-Met<sup>ΔFlt4</sup> se detecta la presencia de vasos sanguíneos con tinción azul (flechas rojas) que se identifican por su contenido en eritrocitos o por la estructura de la pared vascular. Los linfáticos se señalan con flechas negras.

## 6.2.2 Inactivación de c-Met en el endotelio linfático de animales adultos

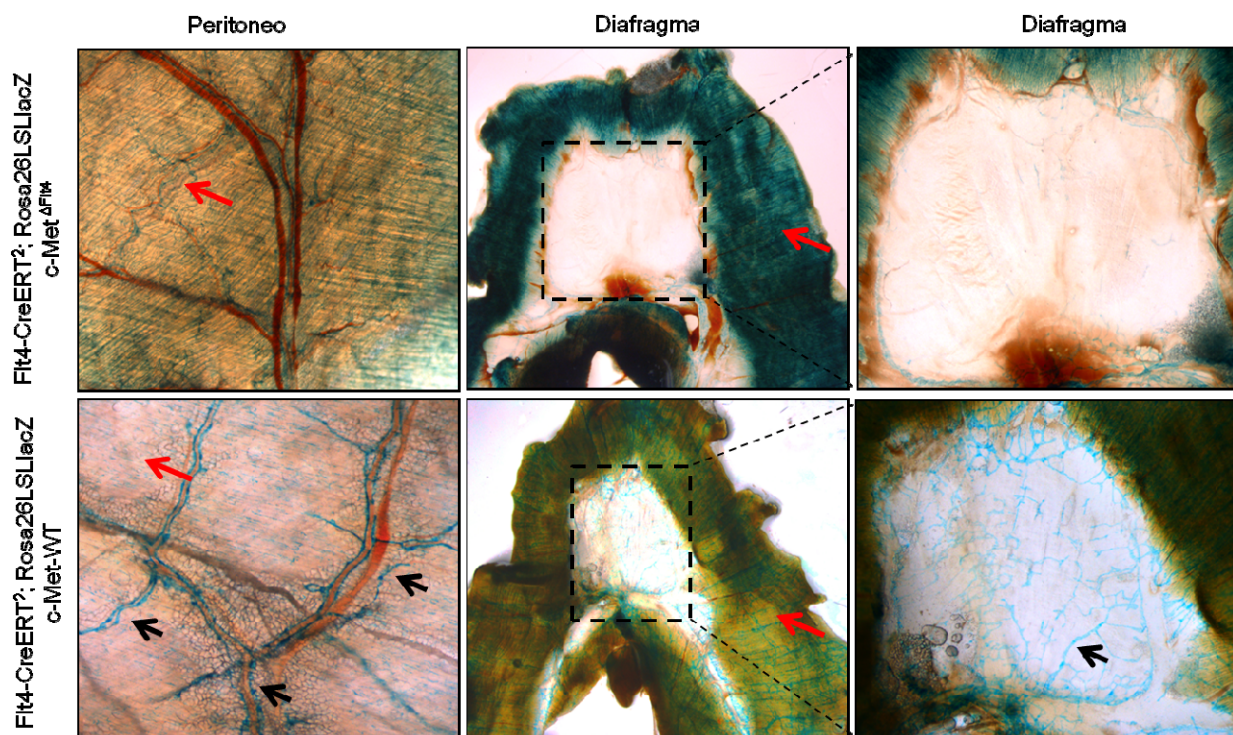
### 6.2.2.1 Estudio de la inactivación de c-Met en condiciones fisiológicas

Para estudiar el efecto de la inactivación de c-Met en endotelio linfático adulto, animales c-Met<sup>fl/fl</sup>, heterocigotos para Flt4-CreERT<sup>2</sup> y Rosa26LSLlacZ se trataron con tamoxifeno en la dieta desde el destete (3 semanas de edad) hasta 15 semanas de edad. La dieta se prolongó durante 12 semanas para



conseguir una inactivación eficiente de c-Met en el endotelio adulto. Tras la finalización del tratamiento, tanto los animales silvestres para c-Met, como los animales c-Met<sup>ΔFlt4</sup> presentaban un aspecto normal, sin alteraciones notables a nivel de tamaño o de peso.

Muestras de los distintos tejidos se procesaron para su tinción con X-Gal y posterior análisis. Igual que se observa en tejidos de animales c-Met<sup>ΔFlt4</sup> en los que la inactivación de c-Met se induce durante el desarrollo embrionario a E15.5 (Apartado 6.2.1 de resultados), animales c-Met<sup>ΔFlt4</sup> adultos presentan una coloración azul mucho más extensa en todos los tejidos analizados (Figura 52). En diafragma y peritoneo se observa una reducción en el número de vasos linfáticos teñidos con X-Gal y sin embargo se produce un incremento generalizado de tinción vascular en toda la región muscular en estos órganos (Figura 52).

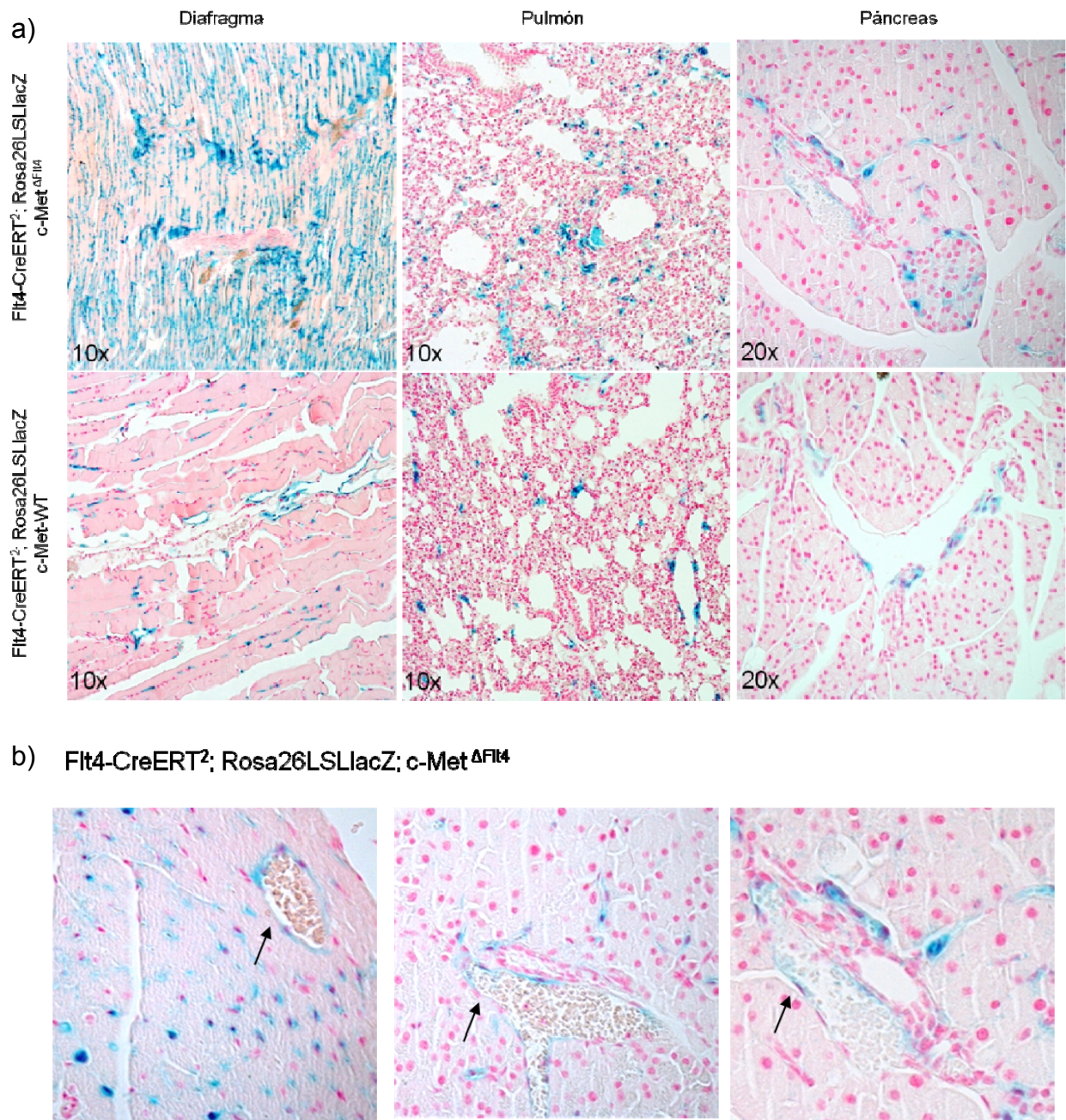


**Figura 52:** Tinción X-Gal *whole mount* de peritoneo y diafragma para los animales Flt4-CreERT²; Rosa26LSLlacZ; c-Met<sup>ΔFlt4</sup> y sus respectivos controles c-Met WT tratados con tamoxifeno durante un periodo de 12 semanas. Se observa un cambio en el patrón de tinción con X-Gal entre los animales c-Met<sup>ΔFlt4</sup> y los c-Met WT. Se produce una disminución en el número de vasos linfáticos que presentan tinción azul (flechas negras) y un incremento de tinción en la zona muscular tanto de diafragma como de peritoneo (flechas rojas).

El estudio histopatológico de los tejidos teñidos con X-Gal y contrateñidos con NFR pone de manifiesto una vez más, no sólo un incremento en el número de vasos azules en los tejidos, sino que además se encuentra con mucha frecuencia vasos sanguíneos o al menos vasos que contienen eritrocitos cuyo endotelio presenta coloración azul. (Figura 53). El análisis inmunohistoquímico con anticuerpos frente a Lyve-1 no revela diferencias significativas en cuanto al número de vasos linfáticos positivos para Lyve-1 en ninguno de los tejidos analizados.

En resumen, también en adulto, una vez que el sistema linfático está establecido, la eliminación de c-Met en el endotelio linfático produce el mismo tipo de respuesta que su inactivación durante el desarrollo

embrionario, un aumento en el número total de vasos positivos para X-Gal y una disminución de vasos linfáticos teñidos con X-Gal, además de la aparición de vasos sanguíneos teñidos con X-Gal.



**Figura 53:** Estudio histológico de la tinción con X-Gal contrateñida con NFR de los animales Flt4-CreERT<sup>2</sup>;Rosa26LSLlacZ; c-Met<sup>ΔFlt4</sup> y sus respectivos controles tratados con tamoxifeno durante un periodo de 12 semanas. a) Imágenes representativas de las diferencias encontradas en el patrón de tinción con X-Gal en diafragma, páncreas y pulmón. La tinción azul está más generalizada en los animales c-Met<sup>ΔFlt4</sup> b) Detalle de vasos sanguíneos con coloración azul (Flechas negras) presentes en los animales en los que c-Met ha sido inactivado. En los animales control no se han encontrado vasos sanguíneos con esta tinción.

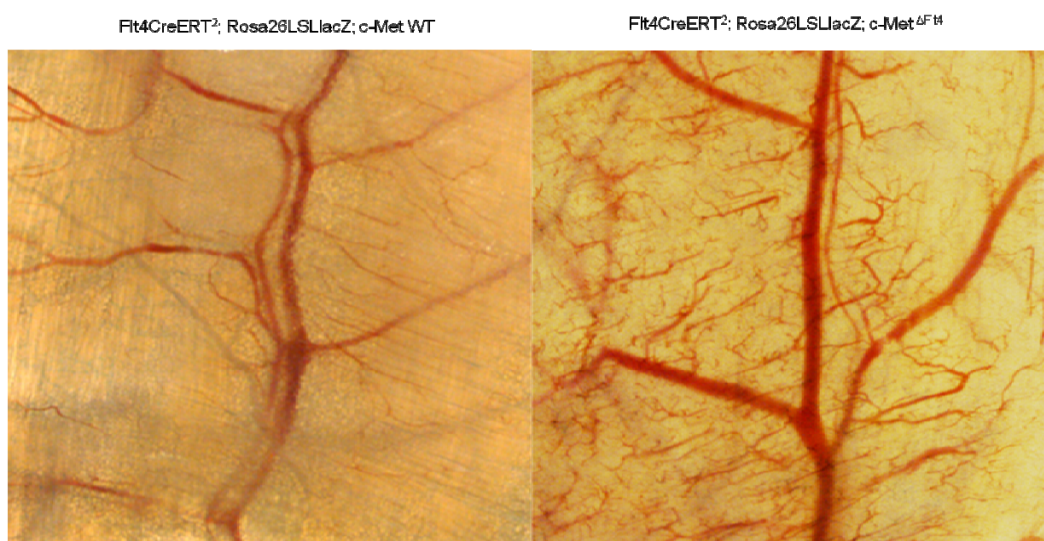


### 6.2.2.2. Estudio de la inactivación de c-Met en linfangiogenesis durante un proceso inflamatorio

Finalmente, en esta primera caracterización del fenotipo asociado a la eliminación de c-Met en el endotelio linfático nos propusimos analizar si vasos linfáticos que no expresan c-Met responden de manera normal ante una respuesta inflamatoria que va asociada a una inducción de linfangiogenesis.

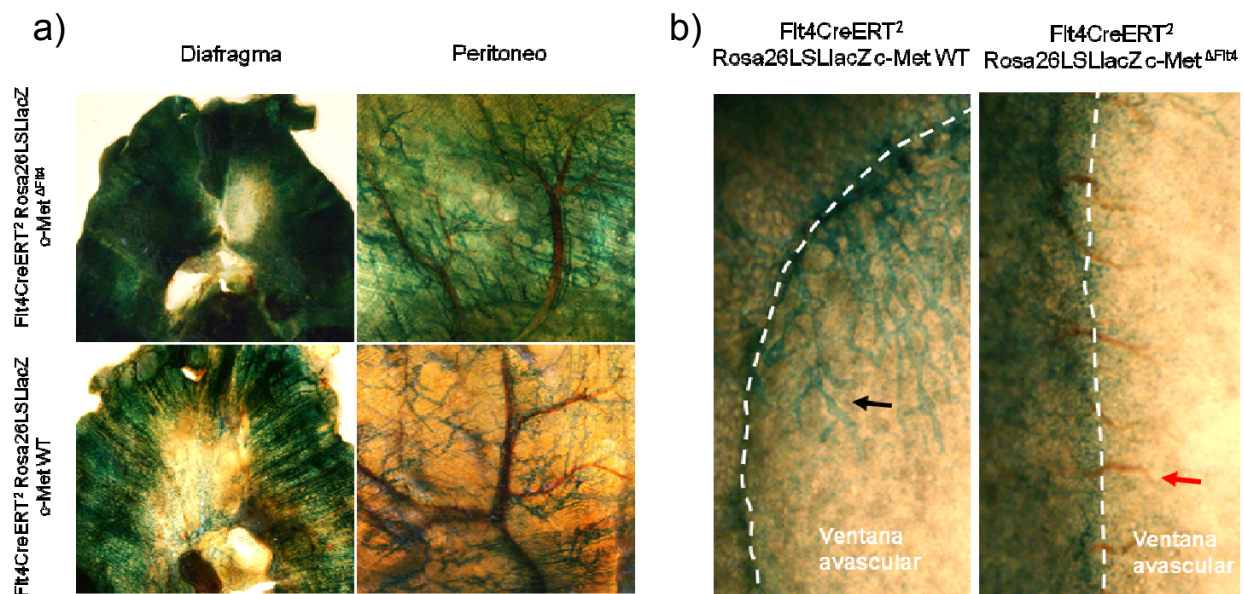
Con este objetivo se trató un grupo de animales  $Flt4-CreERT^2$ ;  $Rosa26LSLlacZ$ ;  $c-Met^{f/f}$  y sus respectivos controles de genotipo silvestre para c-Met, con dieta de tamoxifeno desde la semana 6 de edad hasta la semana 14, durante un periodo total de 8 semanas. Una vez finalizado el tratamiento se les dio a los animales dieta normal, sin tamoxifeno, durante una semana para permitir la eliminación del tamoxifeno del sistema. A las 15 semanas de edad se comenzó el protocolo de inflamación por inyección intraperitoneal de ACF siguiendo el protocolo descrito en el apartado 14 de materiales y métodos. Se eligió este protocolo porque permite inducir una respuesta inflamatoria generalizada, que nos permitiese un análisis preliminar rápido de la respuesta linfangiogenica en ausencia de c-Met. Todos los animales que formaban parte del ensayo fueron sacrificados tres semanas después del inicio del tratamiento con ACF, tiempo que ya habíamos caracterizado (apartado 3.2.1 de resultados) como el momento de máxima expresión de VRGFR3 y por tanto de la respuesta linfangiogenica.

El análisis macroscópico de los animales a las 3 semanas de tratamiento permitió concluir que el 100% de los animales  $c-Met^{ΔFlt4}$  presentaban líquido ascítico en la cavidad peritoneal. El 80% de ellos retenía un volumen superior a 1ml de líquido en el abdomen. Por el contrario sólo el 20% de los animales control presentaban ascitis y el volumen de líquido abdominal era siempre inferior a 1ml. Este hecho pone de manifiesto algún tipo de alteración en la capacidad de drenaje del sistema linfático en respuesta a la inflamación. Además, en los animales  $c-Met^{ΔFlt4}$  se observa un patrón de vasos sanguíneos alterado, que se manifiesta macroscópicamente y que consiste en una mayor densidad de capilares sanguíneos en el peritoneo de animales  $c-Met^{ΔFlt4}$  tratados con ACF (Figura 54).



**Figura 54:** Imagen del peritoneo de animales control y  $c-Met^{ΔFlt4}$  tras un tratamiento de 8 semanas de dieta con tamoxifeno y con ACF. Se observa un patrón vascular alterado en el animal  $c-Met^{ΔFlt4}$ .

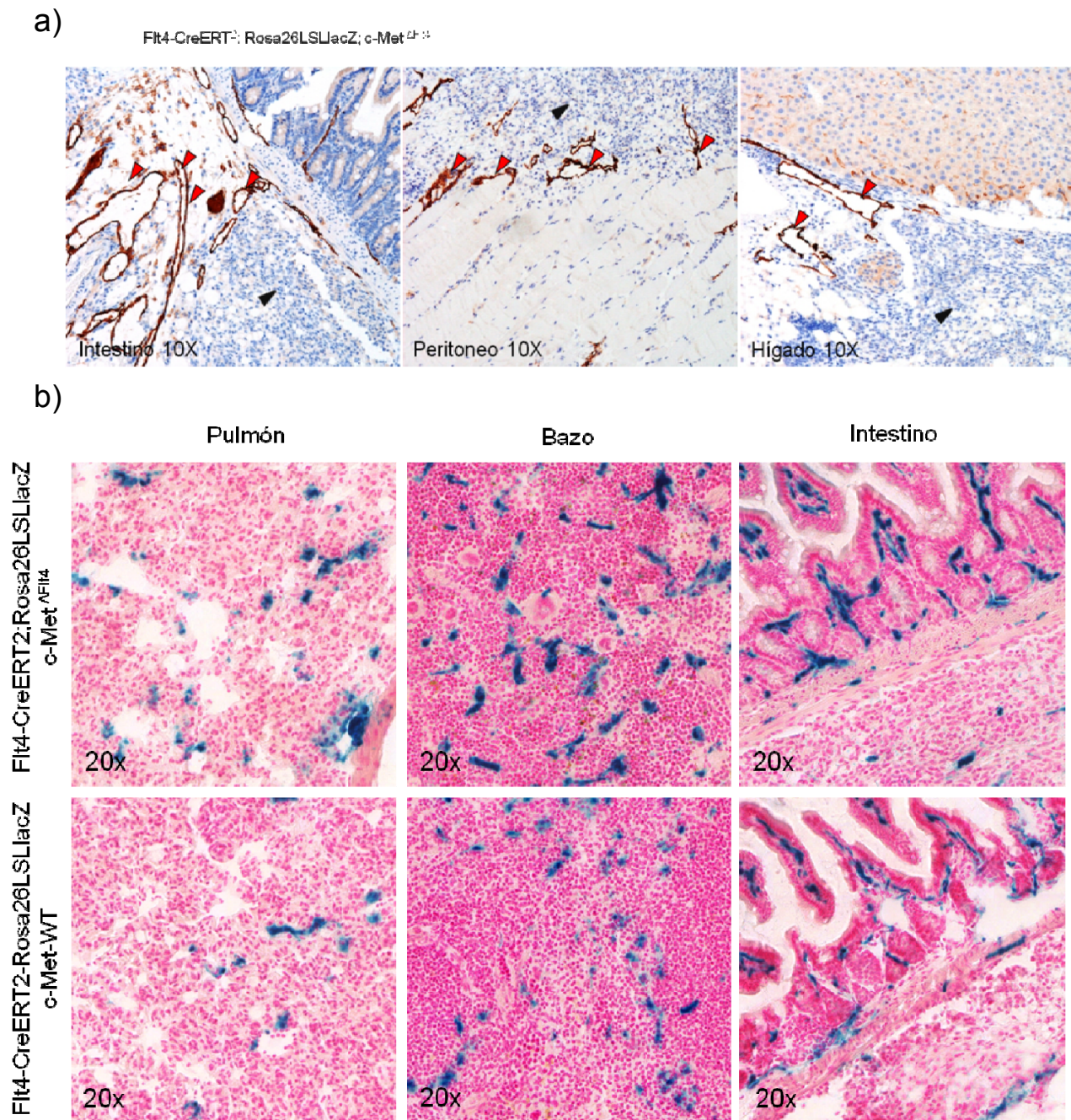
Tras la observación macroscópica, igual que en los análisis anteriores, se procesaron diversos tejidos de los animales tratados con ACF para tinción con X-Gal. El resultado de dicha tinción es consistente con los resultados obtenidos hasta el momento. Los animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Fit4}}$  presentan mucha más coloración azul en sus tejidos (Figura 55a) que está asociada a una mayor tinción de estructuras vasculares. Además, en el mesenterio de los animales control la ventana avascular está siendo colonizada por vasos linfáticos que empiezan a penetrar en esta región formando una red de capilares linfáticos positivos para X-Gal. Sin embargo en los animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Fit4}}$  no se observan vasos linfáticos teñidos en las ventanas a vasculares, mientras que sí se observan capilares sanguíneos penetrando esta zona (Figura 55b).



**Figura 55:** Tinción con X-Gal en animales tratados con dieta de tamoxifeno durante 8 semanas seguida de ACF. a) Diafragma y peritoneo de animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Fit4}}$  y  $c\text{-Met wt}$ . Se observa un incremento de tinción en los animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Fit4}}$  con respecto a sus controles. b) Imágenes de las ventanas avasculares del mesenterio para ambos grupos de tratamiento. Los animales de genotipo silvestre para  $c\text{-Met}$  presentan una proliferación de capilares linfáticos hacia la ventana avascular (flecha negra). Por el contrario los animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Fit4}}$  presentan una proliferación de capilares sanguíneos (flecha roja).

El estudio histológico mediante tinción con Lyve1 puso de manifiesto que en todos los tejidos estudiados se producía una dilatación de los vasos linfáticos situados entre la zona sana del tejido y el infiltrado inflamatorio que lo rodea (Figura 56a) poniendo de manifiesto que ante la ausencia de  $c\text{-Met}$  los vasos linfáticos son capaces de responder al menos en parte ante un proceso inflamatorio, drenando el fluido que se acumula en el tejido como consecuencia de la inflamación. Sin embargo, el que la ascitis que se observa en los animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Fit4}}$  sea considerablemente más acusada que en los animales control indica que la respuesta de los vasos en ausencia de  $c\text{-Met}$  no es eficiente. Además en cortes histológicos la tinción con X-Gal muestra un incremento general en el número de células con coloración azul en los animales  $c\text{-Met}^{\Delta\text{Fit4}}$  y es posible la detección de capilares sanguíneos completamente teñidos de azul (Figura 56b).

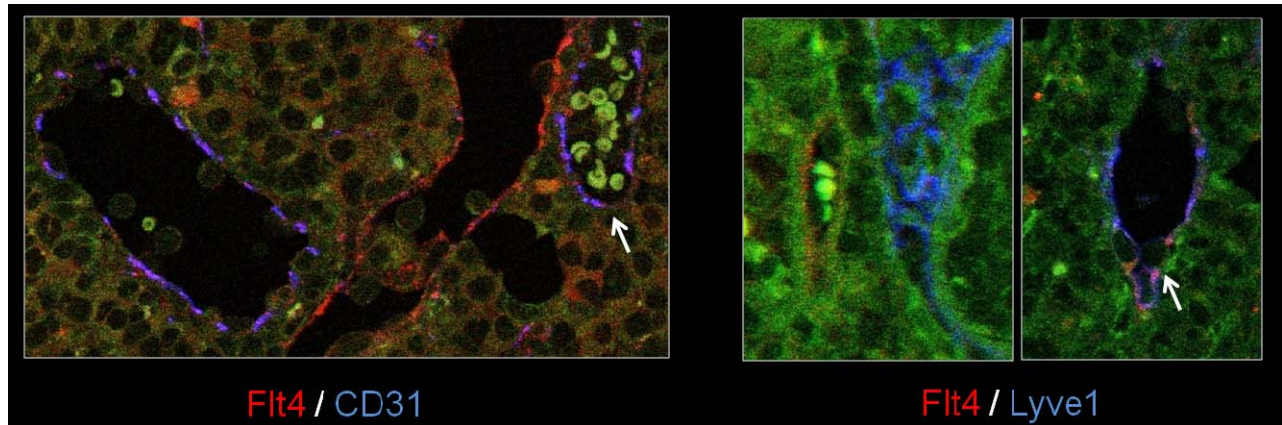




**Figura 56:** a) Estudio inmunohistoquímico de cortes de parafina con Lyve1 de intestino, peritoneo e hígado de animales c-Met<sup>ΔFlt4</sup> tratados con dieta de TAM durante 8 semanas seguidas de un protocolo de inducción de inflamación con ACF. Con flechas rojas se indican los vasos linfáticos que se generan entre la zona sana del tejido y el infiltrado inflamatorio que lo rodea (que se señala con flechas negras). b) Análisis de la tinción con X-Gal de cortes de criostato de pulmón, bazo e intestino contrateñidos con NFR, de animales c-Met<sup>ΔFlt4</sup> y sus controles C-Met WT. Los animales c-Met<sup>ΔFlt4</sup> presentan un incremento de tinción azul en todos los tejidos analizados.

Finalmente, se realizó un análisis por inmunofluorescencia con anticuerpos frente a Lyve1 y VEGFR3 para tratar de identificar el patrón de expresión de VEGFR3 en ausencia de c-Met. En la figura 57 se muestra la doble tinción para estos anticuerpos, obteniendo un patrón de expresión no solapante entre

ambos. La expresión de Lyve1 se encuentra, como era de esperar, en los vasos linfáticos y vénulas de endotelio alto presentes en el ganglio linfático. El patrón de expresión de Flt4 no solapa con éste en su totalidad, y como se ve en el detalle de la figura, tenemos expresión de este receptor en vasos sanguíneos. Estos datos junto con todos los anteriores, parecen apoyar la idea de que la ausencia de c-Met en el endotelio linfático origina un cambio en el patrón de expresión de VEGFR3 que pierde su especificidad por el endotelio linfático.



**Figura 57:** Inmunofluorescencia de un ganglio linfático de animales Flt4-CreERT<sup>2</sup>;Rosa26LSLLacZ- c-Met<sup>ΔFlt4</sup> tratados con dieta de tamoxifeno durante 8 semanas y con ACF con anticuerpos frente a Lyve1 (azul), Flt4 (rojo) y CD31 (azul). a) Inmunofluorescencia con CD31/Flt4. Se indica con una flecha blanca un vaso sanguíneo que presenta ambos marcadores. b) Inmunofluorescencia para Lyve1/Flt4. La tinción con Flt4 aparece tanto en vasos sanguíneos (que se reconocen por su contenido en eritrocitos) como en vasos linfáticos coincidiendo con la tinción de lyve1 (flecha blanca).



## DISCUSIÓN





En este trabajo se describe la generación y caracterización de dos líneas de ratones genéticamente modificados, que son herramientas únicas para el estudio del sistema vascular linfático in vivo: la línea Flt4-EGFPluc y la línea Flt4-CreERT2. Las aplicaciones de ambas son diferentes y complementarias. La línea Flt4-EGFPluc permite el seguimiento y cuantificación in vivo de procesos de linfangiogénesis que implican un aumento en los niveles de expresión de Flt4 (VEGFR3), mientras que la línea Flt4-CreERT2 permite generar modelos condicionales inducibles específicamente en el endotelio linfático para estudiar este sistema y sus funciones a nivel genético. La generación de estos modelos en ratón supone una contribución importante al abordaje del estudio de este sistema in vivo en modelos animales.

## Diseño de los modelos Flt4-EGFPluc y Flt4-CreERT2

La estrategia diseñada para la generación de estas líneas es común para ambas y consiste en la construcción, mediante gene targeting en el gen Flt4, de un mensajero bicistrónico que codifica para el receptor VEGFR3 y para la proteína trazadora EGFPluc (en el caso del modelo Flt4-EGFPluc) o para la recombinasa CreERT2 (en el modelo Flt4-CreERT2) en el mismo mensajero. Para ello se introdujo la secuencia codificante de la fusión EGFPluc o de la fusión CreERT2 en la región 3'UTR del gen Flt4 precedidas de un elemento IRES procedente del virus de la encefalomiocarditis. La ventaja de esta estrategia es que la expresión del segundo gen, a diferencia de los modelos transgénicos clásicos, reproduce fielmente la expresión y la regulación del locus endógeno, en este caso Flt4. Sin embargo, al no ser una estrategia que conduce a una sobreexpresión a nivel de mensajero, sino que los niveles de expresión son los del gen Flt4, en el modelo Flt4-EGFPluc la molécula trazadora puede ser más difícil de detectar. De hecho en esta línea, en animal adulto, la fluorescencia de la EGFP no se puede distinguir sobre la autofluorescencia del tejido. Además, en un mensajero bicistrónico, la traducción del segundo gen, precedido del elemento IRES, es algo menos eficiente que la del gen que ocupa la posición 5' en el mensajero, lo cual contribuye también a la dificultad de detección de la EGFP. Alternativamente, se podría generar un modelo knockin, en el que la secuencia codificante del gen endógeno, o parte de ella, se sustituye por la secuencia del gen que interesa expresar. Sin embargo, esto lleva consigo la generación de un alelo knockout que puede dar lugar a un fenotipo por haploinsuficiencia en heterocigosis, o en el mejor de los casos, evita el poder utilizar el modelo en homocigosis. De hecho en el caso del gen Flt4, el knockout constitutivo de Flt4 es letal durante el desarrollo embrionario en homocigosis y no está totalmente claro que no haya ningún fenotipo en heterocigosis (Dumont et al. Science 1998).

## Modelo Flt4-EGFPLuc

En contraste con la variedad de modelos *reporter* generados en ratón para el estudio de los vasos sanguíneos y la angiogénesis por técnicas de imagen óptica in vivo (algunos ejemplos son los modelos transgénicos Tie1-EGFP (Ilijin et al. FASEB xxx), Tie2-EGFP (Motoike et al. Genesis 2000); VEGFR2-EGFP o VEGFR2-Luc (Zhang et al. Blood 2004)) ningún modelo de este tipo ha sido aun descrito

específicamente para el sistema vascular linfático. Por tanto, el modelo Flt4-EGFPluc es el primer modelo *reporter* para el estudio del sistema linfático in vivo. Este trabajo demuestra que el modelo puede ser utilizado para monitorizar y cuantificar in vivo la expresión de VEGFR3 en condiciones fisiológicas, pero también para el seguimiento de procesos de linfangiogénesis, asociados a inflamación y en tumores, en que se induce la expresión de VEGFR3. La doble detección por fluorescencia y luminiscencia permite la detección de VEGFR3 a nivel celular (mediante seguimiento de la fluorescencia emitida por la EGFP) y también cuantificar la expresión de VEGFR en animal completo.

Hay que tener en cuenta que un aumento en la señal de bioluminiscencia en el modelo Flt4-EGFPluc en un determinado ensayo o proceso biológico refleja un incremento global de expresión de VEGFR3 durante dicho proceso a la que pueden contribuir varios factores. Uno de ellos es la inducción de la expresión de VEGFR3 en los vasos linfáticos como consecuencia de una activación del endotelio linfático o como consecuencia de un incremento en el número de vasos, pero también contribuye un incremento en el número total de células que expresan VEGFR3, sobre todo en linfangiogénesis asociada a inflamación ya que algunas células inflamatorias, subpoblaciones de monocitos y macrófagos, también expresan VEGFR3. Por otro lado hay que tener en cuenta que aunque a nivel transcripcional la regulación de la expresión de VEGFR3 y de luciferasa debe ser la misma en el modelo Flt4-EGFPluc, la regulación post-traducciona de ambas proteínas, así como la eficiencia de la traducción, puede ser diferente de una a otra. La estabilidad de la luciferasa puede ser mayor o menor que la de VEGFR3, de manera que el aumento relativo de los niveles de luciferasa en estos ensayos puede no ser el mismo que el aumento relativo en los niveles de VEGFR3. Aun teniendo en cuenta estas consideraciones, en general, en todos los ensayos realizados para validar el modelo Flt4-EGFPluc se ha observado una correlación entre el aumento en el número de vasos linfáticos y la actividad de luciferasa, por lo que se puede afirmar que el modelo realmente funciona como un *reporter* de linfangiogénesis. Pero además, el modelo Flt4-EGFPluc puede tener utilidad como un *reporter* in vivo de procesos inflamatorios en los que hay reclutamiento de monocitos y macrófagos.

La expresión de VEGFR3 está regulada durante el desarrollo. Su expresión es alta durante el desarrollo embrionario donde inicialmente se expresa en el endotelio de los vasos sanguíneos a partir del día E9.5 en el ratón. Alrededor del día E13.5 su expresión se hace específica del endotelio linfático. La detección de emisión de fluorescencia directa de la EGFP en el modelo Flt4-EGFPluc durante el desarrollo embrionario confirma estos resultados. Además este es el primer modelo donde células positivas para VEGFR3 pueden ser visualizadas directamente evitando artefactos asociados a las técnicas de inmunodetección.

En el periodo postnatal VEGFR3 es esencial para la supervivencia y el mantenimiento de los vasos linfáticos durante las dos primeras semanas de edad aproximadamente. A partir de este momento los vasos linfáticos se hacen independientes de VEGFR3 (Karpanen et al. Am. J. Pathol. 2006) y el receptor se hace esencial sólo para el crecimiento de nuevos vasos linfáticos. Mediante detección de la señal de luminiscencia en el modelo Flt4-EGFPluc hemos podido establecer que durante las semanas 2 y 4 del desarrollo postnatal hay una disminución global de la expresión de VEGFR3 de un orden de magnitud, que coincide con el periodo en que los vasos linfáticos se hacen independientes de VEGFR3. A partir de aproximadamente 8 semanas de edad, coincidiendo con el inicio del periodo adulto, la expresión de

VEGFR3 se estabiliza en un nivel basal. En adulto VEGFR3 se expresa fundamentalmente en capilares linfáticos. VEGFR3 sólo se detecta en vasos sanguíneos en la angiogénesis tumoral, en que algunos vasos sanguíneos de nueva formación expresan VEGFR3.

En mamíferos, en la fase adulta, todos los órganos contienen vasos linfáticos, excepto tejidos avasculares como epidermis, córnea y cartílago y algunos tejidos vascularizados como cerebro, médula y retina (Karpanen y Alitalo, 2008). La medida relativa de la expresión de VEGFR3 mediante cuantificación de la actividad de luciferasa en extractos de proteína procedente de diferentes órganos refleja una variabilidad en los niveles de expresión en los diferentes órganos. La mayor señal de luciferasa se encuentra en hígado y testículo. En hígado la mayor señal de luciferasa puede reflejar la expresión de VEGFR3 en los ductos hepáticos que contienen macrófagos positivos para VEGFR3, lo cual se confirma por inmunohistoquímica. Sin embargo, la expresión en testículo es más difícil de explicar y no ha sido descrita previamente. Por inmunohistoquímica se detecta una elevada tinción positiva en células de los espacios intertubulares, pero no dentro de los túbulos seminíferos. La naturaleza o el origen de estas células es desconocido por el momento. En todos los extractos analizados se detecta una disminución de 2 a 4 veces en la expresión de VEGFR3 entre las 4 y las 14 semanas de edad, coincidiendo con la caída en los niveles de expresión que se detecta en el animal completo.

## Detección de linfangiogénesis asociada a inflamación

La relación entre inflamación y linfangiogénesis está ampliamente documentada. Aunque aún no se conoce con precisión los mecanismos celulares y moleculares que conectan ambos procesos, sí está establecido que las células inflamatorias secretan citoquinas, entre ellas VEGFC, que estimulan la proliferación de los vasos linfáticos. Los vasos linfáticos a su vez drenan el exceso de fluido y reducen la formación de edema en el sitio de la inflamación. Tres diferentes tipos de ensayos in vivo han sido realizados en el modelo Flt4-EGFPluc para validar la utilidad del mismo como reporter de linfangiogénesis asociada a inflamación. En todos ellos se ha detectado una inducción en la señal de luminiscencia asociada a éstos procesos, que refleja un aumento en los niveles de expresión de VEGFR3 y un aumento en la densidad de vasos linfáticos.

Se conoce poco sobre la contribución de la linfangiogénesis a procesos de cicatrización de heridas cutáneas. Los ensayos de cicatrización realizados en el modelo Flt4-EGFPluc ponen de manifiesto un aumento en los niveles de luciferasa, y por tanto de VEGFR3 en la herida desde casi el comienzo de la cicatrización, con un pico de emisión entre los 7 y los 12 día y un máximo de inducción de unas 5 veces sobre el nivel basal a día 8 de cicatrización cuando la cicatrización es de un 70%, es decir sólo un 30% del área total de la herida permanece sin cerrar. Este aumento en la señal de luminiscencia se corresponde con un aumento similar en la densidad de vasos linfáticos en el máximo de emisión y por tanto refleja verdaderamente un proceso de linfangiogénesis. A partir del día 8 la señal disminuye pero no alcanza de nuevo el nivel basal hasta el día 20-24, algo después de que la cicatrización es completa (día 15). Sin embargo, en animales tratados con DXT, un antiinflamatorio que bloquea el reclutamiento de macrófagos, esta inducción se hace mucho menor (de sólo unas dos veces) y el máximo de emisión se produce a los

14 días, en lugar de los 8 días, retrasando el proceso de cicatrización y poniendo de manifiesto la importancia de la inflamación en el proceso de cicatrización.

La cinética de inducción de VEGFR3 que se observa en el modelo Flt4-EGFPluc está en consonancia con algunos resultados descritos anteriormente, aunque nunca antes se había seguido una cinética de expresión de VEGFR3 durante el proceso de cicatrización. El análisis por inmunohistoquímica de heridas cutáneas en cerdos revela la presencia de nuevos vasos linfáticos positivos para VEGFR3, formados a partir de vasos linfáticos presentes en la periferia de la herida, desde una fase temprana del proceso, a partir del día 5 de cicatrización. La presencia de estos vasos es transitoria, no permanecen en la zona de cicatrización sino que desaparecen cuando el tejido reepitelializa (Paavonen et al. 2000). En ratones, vasos positivos para VEGFR3 aparecen en el tejido de cicatrización incluso a día 3 en la zona subcutánea, y entre día 3 y 5 en la dermis (Ji et al. 2004). Por tanto, esta comparación pone de manifiesto la utilidad del modelo para el estudio de linfangiogénesis durante la cicatrización, pero además el modelo Flt4-EGFPluc permite un seguimiento y cuantificación más directa del proceso.

La linfangiogénesis, junto con la dilatación de los vasos linfáticos en la periferia de la herida puede contribuir al proceso de cicatrización de varias formas. Por un lado contribuye a eliminar el exceso de fluido intersticial y la formación de edema durante el proceso de cicatrización. Por otro lado, contribuye al reclutamiento de células del sistema inmune hacia el tejido dañado. Experimentos en modelos animales ponen de manifiesto la relevancia de la linfangiogénesis en procesos de cicatrización. En ratones genéticamente predispuestos al desarrollo de diabetes (db/db), patología en la cual el proceso de cicatrización se ve retrasado, la cicatrización mejora con el tratamiento con adenovirus que expresan VEGF-C durante la cicatrización. Del mismo modo, bloqueo de la señal endógena de VEGFC o D retrasa la cicatrización en este modelo (Saaristo et al. 2006).

Nuestros resultados ponen de manifiesto también la relevancia de la inflamación en el proceso de cicatrización. La DXT, que bloquea el reclutamiento de macrófagos, retrasa la cicatrización y reduce más de la mitad la señal de luminiscencia y por tanto de expresión de VEGFR3 en la herida en el modelo Flt4-EGFPluc. Esta disminución en la señal de luciferasa se correlaciona con una reducción en la densidad de vasos linfáticos en el tejido de granulación. Una de las primeras fases en el proceso de cicatrización es el reclutamiento de monocitos circulantes que se diferencian a macrófagos. La contribución de los macrófagos a la inflamación durante el proceso de cicatrización está ampliamente documentada. Los macrófagos son los principales secretores de factores de crecimiento y citoquinas, entre ellas, VEGFC y VEGFD (Schopmann et al. Am. J. Pathol. 2002) que estimulan la proliferación de fibroblastos, así como la formación de nuevos vasos sanguíneos y linfáticos. Además, algunas subpoblaciones de macrófagos que expresan VEGFR3, además del marcador de macrófagos F4/80, se pueden transdiferenciar a células endoteliales linfáticas e incorporarse al endotelio de los nuevos vasos linfáticos generados durante la cicatrización (Maruyama et al. Am. J. Pathol. 2007). VEGFC contribuye también al reclutamiento de células inflamatorias y este puede ser otro mecanismo por el que el tratamiento con VEGFC mejora la cicatrización en situaciones patológicas (Saaristo et al. 2006). Nuestros resultados demuestran que el reclutamiento de células inflamatorias contribuye de forma muy importante a la inducción de linfangiogénesis durante el proceso de cicatrización cutánea y a mejorar el proceso de cicatrización.



La comparación entre la cinética de expresión de VEGFR3 en el modelo Flt4-EGFPluc y la de expresión de VEGFR2 en ratones transgénicos Vegfr2-luciferase (Zhang et al. 2004) pone de manifiesto que angiogénesis y linfangiogénesis son procesos que transcurren simultáneamente durante la cicatrización. Es interesante que, a diferencia de lo que se ha descrito y nosotros hemos observado en tumores, los nuevos vasos sanguíneos no expresan VEGFR3 en este ensayo, lo que sugiere que los factores de crecimiento o citoquinas que inducen la expresión de VEGFR3 en vasos sanguíneos en tumores son distintos de las citoquinas que inducen linfangiogénesis en las heridas. Esto puede reflejar la contribución de la hipoxia en los tumores que no se da o es mucho menos acusado en cicatrización de heridas cutáneas (Nilsson et al. FASEB J. 2004).

La administración intraperitoneal de ACF en ratones estimula la respuesta inmune mediada por células T y la producción de ciertas inmunoglobulinas. Ha sido ampliamente utilizado en ratón para la inducción de mielomas. Además provoca una fuerte reacción inflamatoria local con formación de tejido granulomatoso. El mecanismo de acción implica la estimulación de la producción de TNF (factor de la necrosis tumoral) entre otros factores. También se ha descrito la inducción de linfangiomas, o tumores procedentes del endotelio linfático, por inyección intraperitoneal de adyuvante incompleto de Freund (que carece de mycobacteria inactivada) en ratón, aunque la naturaleza exacta de estos tumores no está del todo clara (Mancardi et al. 1999). La formación de estas hiperplasias o tumores parece deberse a una estimulación directa de los vasos linfáticos que drenan el adyuvante. Por otro lado se ha descrito la estimulación de la proliferación de vasos linfáticos por la inyección de adyuvante de Freund en la almohadilla plantar del ratón (Kraal et al. Int. Immunol. 1994) y éste es un método clásico para estudiar linfangiogénesis in vivo.

La inyección de adyuvante de Freund en el modelo Flt4-EGFPluc permite inducir un proceso de linfangiogénesis asociado a inflamación por un mecanismo diferente al de la cicatrización cutánea. En este caso también se produce una respuesta inflamatoria aunque la contribución de los macrófagos a este proceso es menor que al de cicatrización y de hecho, prácticamente no aparecen células inflamatorias positivas para VEGFR3 en los infiltrados inflamatorios. La fuerte respuesta linfangiogénica que se produce en la cavidad peritoneal y que afecta a la mayor parte de los órganos contenidos en ella se refleja en una inducción de VEGFR3 y como consecuencia en la emisión de luminiscencia del orden de 4-5 veces sobre el nivel basal. La respuesta es transitoria y los vasos linfáticos una vez establecidos dejan de expresar VEGFR3.

El tercer ensayo de linfangiogénesis dependiente de inflamación que se ha probado en el modelo Flt4-EGFP luc es el ensayo de hipersensibilidad por contacto inducida por tratamiento tópico con oxazolona. La reacción local a la aplicación tópica de oxazolona se caracteriza por el desarrollo de edema y la infiltración de linfocitos T, macrófagos y neutrófilos. La angiogénesis, mediada por la señalización a través de VEGFR2, tiene un papel importante en este proceso (Zhang et al. 2004). Nuestro trabajo demuestra que durante este proceso inflamatorio tiene lugar también una inducción de la expresión de VEGFR3 y un incremento en la densidad de vasos linfáticos en la zona además de un ensanchamiento de los mismos. Mediante tratamiento con DXT hemos demostrado también que la inflamación es esencial para el proceso de linfangiogénesis.

### Detección de linfangiogénesis tumoral

En diferentes ensayos de tumorigénesis, tanto por carcinogénesis química como en ensayos de xenografts con líneas tumorales, se ha podido comprobar que el modelo Flt4-EGFPluc permite el seguimiento y cuantificación in vivo de procesos de linfangiogénesis asociada al crecimiento tumoral mediante detección de luminiscencia en el animal completo, no sólo en la periferia del tumor, sino también a nivel de ganglios linfáticos. Esta es una de las aplicaciones más relevantes del modelo por las implicaciones que tiene a nivel de desarrollo de terapias antitumorales dirigidas a bloquear el proceso de expansión tumoral y formación de metástasis.

En ensayos de carcinogénesis epidermoide inducida por tratamiento con DMBA/TPA el modelo permite detectar la formación de nuevos vasos linfáticos en la periferia del tumor. El protocolo de carcinogénesis química con DMBA/TPA ha sido ampliamente utilizado para estudiar iniciación, promoción y progresión (malignización) de tumores de piel en ratón y reproduce bastante fielmente la evolución de carcinomas epidermoides humanos (Yuspa et al. 1998). La iniciación se induce por una sola aplicación tópica de 7,12-dimetil-benz[a]antraceno (DMBA). La promoción se consigue por una aplicación repetitiva del agente promotor de tumores 12-O-tetradecanoilforbol-13 acetato (TPA)), que causa hiperplasia e inflamación crónicas y posteriormente una expansión clonal selectiva que resulta en el desarrollo de papilomas benignos (Yuspa et al. 1998). Durante la tercera etapa, la de progresión tumoral, se produce la conversión de papilomas benignos a carcinoma epidermoide invasivo que, al igual que los tumores humanos, contienen mutaciones en el gen H-ras (Nelson et al. 1992). Esta primera fase de inflamación crónica inducida por la aplicación del TPA, probablemente contribuye significativamente a la linfangiogénesis que se observa en la periferia de los papilomas analizados y se refleja también en un aumento en la señal de luciferasa desde los primeros momentos del ensayo. Las células inflamatorias pueden contribuir a la linfangiogénesis mediante la expresión de VEGF-C. Además, en ratones transgénicos K14-GFP-VEGFC, sometidos al mismo protocolo de carcinogénesis con DMBA/TPA se ha podido demostrar que la expresión de VEGFC por las células del tumor primario, que expresan VEGFC bajo el control del promotor K14, contribuye a la inducción de linfangiogénesis tumoral y a la diseminación de los tumores (Hirakawa et al. 2007). En este tipo de tumores en humanos se ha descrito una correlación entre la expresión de VEGF-C y -D en el tumor, la densidad de vasos linfáticos y la aparición de metástasis en ganglios linfáticos de forma que los dos primeros parámetros permiten predecir la formación de metástasis en ganglios linfáticos (Sugiura et al. Int. J. Oncology 2009). En nuestro caso este protocolo no se ha seguido en el modelo Flt4-EGFPluc hasta la etapa de desarrollo de carcinomas epidermoides y por tanto no se ha llegado a monitorizar el proceso de desarrollo de metástasis.

El otro tipo de ensayo que hemos empleado para validar el modelo como reporter de linfangiogénesis tumoral es el de xenografts por inyección subcutánea de líneas tumorales. Antes de establecer la línea Flt4-EGFPluc en el fondo nu/nu (inmunosuprimido) los primeros ensayos de xenograft se realizaron con una línea de melanoma de ratón, la línea B16-V15, de fondo genético C57BL/6 en ratones Flt4-EGFPluc pertenecientes a la generación N5 de retrocruzamiento de la línea Flt4-EGFPluc de fondo genético mixto (129Sv x CD1) con ratones B6-tyr<sup>C-2J</sup> albinos y, por tanto, con aproximadamente un 95% de fondo

C57BL/6. Es posible que al no ser un fondo 100% singénico con el de la línea celular se induzca una respuesta inmune en algunos de los animales que afecte al resultado del ensayo.

La línea B16-V15 de melanoma es una línea muy agresiva que da lugar a la rápida formación de metástasis, especialmente en pulmón y ganglios linfáticos, cuando se inyecta vía intravenosa en la cola del animal. Incluso en animales con fondo genético mixto, antes de retrocruzarse, estas células inyectadas vía intravenosa producen metástasis en el 100% de los animales en ganglios y en pulmón y los animales tienen que ser sacrificados en un periodo de 3-6 semanas después de la inyección. Estas metástasis no se detectaron por medición de luminiscencia en el modelo, en parte debido probablemente al carácter melanocítico de las células con un alto contenido de pigmentación oscura que interfiere con la señal luminiscente. Sin embargo, cuando las células se inyectaron vía subcutánea en animales N5;Flt4-EGFP<sub>luc</sub> estas células formaban tumores de rápido crecimiento. De nuevo, la señal de luminiscencia en el área tumoral se veía bloqueada por la pigmentación oscura de las células pero periferia del tumor que se correlaciona con la aparición de vasos linfáticos peritumorales. También en este caso, en el área del tumor, se produce un bloqueo de la señal de luminiscencia, que se reduce incluso por debajo de la señal basal de la piel, por acumulación de melanina en el tumor. Pero además de la señal en la periferia del tumor, el modelo permitía detectar un aumento de la señal de luminiscencia en ganglios linfáticos (de hasta 4 veces sobre el nivel basal) y en otros órganos internos, principalmente bazo e hígado. La diseminación tumoral y formación de metástasis a través de ganglios linfáticos es una característica común de los melanomas que se conserva en estas células. Existe evidencia experimental de que en melanoma, tanto en humanos como en modelos animales, la linfangiogénesis en el tumor predice la capacidad del tumor de invadir los ganglios linfáticos (Dadras et al. 2005). Esta característica no es exclusiva de los melanomas sino que ha sido descrita también en otros tipos de tumores (humanos o modelos animales) como carcinomas de pulmón, útero, mama, tiroides, próstata y colon (Revisado en Ji, 2009).

Pero además, en el ensayo de xenografts se ha podido establecer una correlación entre la señal de luciferasa detectada en ganglios linfáticos y la capacidad de las células tumorales de formar metástasis en los ganglios linfáticos. De hecho, el mismo tipo de respuesta se observa con líneas tumorales humanas procedentes de carcinomas de colon (SW620) y de pulmón (H460) (inyectadas en animales inmunosuprimidos (nu/nu)).

Los ganglios linfáticos constituyen una entidad funcional y estructural en la que tiene lugar la transferencia de fluido libre de proteínas entre la sangre y el sistema linfático. Aunque se han estudiado ampliamente a otros niveles sólo en los últimos años el proceso de linfangiogénesis en ganglios linfáticos (LGL) inducida por tumores o por inflamación ha empezado a conocerse aunque aun está muy poco caracterizado. Recientes revisiones de este tema, que es uno de los más candentes en la actualidad sobre todo por sus implicaciones en la expansión tumoral y formación de metástasis son (Ji, *Histol Histopathol* 2009; Hirakawa, *Cancer Sci.* 2009; Achen and Stacker, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008; Tobler and Detmar J. *Leukocyte Biol.* 2006). El modelo Flt4-EGFP<sub>luc</sub> constituye una importante contribución al estudio de este proceso ya que permite visualizar y cuantificar in vivo la LGL inducida por tumores desde la fase más temprana del proceso, antes de que se puedan detectar metástasis en ganglios incluso por análisis

histopatológico o cuando sólo células aisladas son detectables en cortes seriados de los ganglios, como ocurre con las células B16V15.

### Implicaciones en el desarrollo de terapias

Función de VEGFC (Ji, 2009 review; introducción).

1- Aplicaciones del modelo

Modelo Flt4-CreERT2

- 1- Elección de CreERT2 para inducir la actividad de Cre
- 2- Distintos protocolos de administración de tamoxifeno
- 3- Trazado de linajes
- 4- c-Met

VEGFR3 y neuropilina-2 se expresan predominantemente en capilares linfáticos. De hecho sobreexpresión de los ligandos de VEGFR3, VEGF-C y -D conduce a hiperproliferación de los capilares pero no de los vasos linfáticos colectores (Veikkola et al. 2001; Saaristo et al. 2002) De igual manera, la inhibición de la señal mediada por VEGFR3 da lugar a hipoplasia de los capilares linfáticos, pero los vasos colectores no se ven afectados (Makinen et al. 2001). En ratones adultos la inhibición de la señal mediada por VEGFR3 bloquea específicamente el crecimiento de nuevos vasos linfáticos mientras que la supervivencia o la función de los vasos ya existentes no se ve afectada (Karpanen 2002?).

Se conoce muy poco sobre la heterogeneidad del endotelio linfático en diferentes tipos de vasos y en diferentes órganos. Es predecible que estas diferencias existan dado la heterogeneidad de funciones especializadas de los vasos linfáticos en diferentes órganos (Karpanen y Alitalo 2007).

La señalización mediada por HGF/c-Met ¿juega un papel importante en el desarrollo y proliferación de los vasos linfáticos junto con las de VEGF-C y -D/VEGFR3 y PDGF-BB/PDGFR? Hay evidencia experimental de que sí aunque muy pocos estudios in vivo. In vivo, prácticamente sólo el de Detmar.

HGF promueve proliferación de células endoteliales linfáticas por un mecanismo independiente de VEGFR3. Además HGF no induce un incremento en la expresión de VEGFC o D (Paper de Detmar de HGF: Kajiya et al. EMBO J. 2005).

Aunque los resultados que se describen en este trabajo son aun resultados preliminares, sí permiten concluir que c-Met es esencial para el correcto desarrollo del sistema vascular y para el mantenimiento de la homeostasis y de la entidad del endotelio linfático en el adulto. Este es el primer modelo de inactivación de c-Met específicamente en endotelio.

Se ha descrito que durante el desarrollo embrionario c-Met se expresa en células endoteliales positivas para Lyve1 en la vena cardinal alrededor del día E12.5 y ocasionalmente en el endotelio de los sacos linfáticos. A día E14.5 la mayoría de las células endoteliales de los sacos linfáticos expresan c-Met, lo que indica que este receptor se expresa en el endotelio linfático durante el desarrollo embrionario en un estadio posterior al de la expresión de VEGFR3, Prox1 o Lyve-1, siendo su expresión más similar a la de

la Podoplanina o al receptor de la neuropilina-2 lo que sugiere un papel para c-Met en la maduración y remodelación de los vasos linfáticos durante el desarrollo (Kajiya et al. 2005).

En este trabajo se muestra que la inactivación de c-Met en el endotelio en embriones c-Met<sup>ΔFlt4</sup> entre los días E10.5 y E12.5 conduce a un aumento en el número de vasos lacZ<sup>+</sup>, la mayoría de ellos con morfología de vasos sanguíneos. En este estadio del desarrollo Flt4 no es todavía específico de vasos sanguíneos por lo tanto no es sorprendente que el fenotipo se manifieste sobre todo a nivel de vasos sanguíneos. Sin embargo macroscópicamente, no se observan grandes diferencias entre los embriones c-Met<sup>ΔFlt4</sup> y los embriones control. Sin embargo, cuando c-Met se inactiva más específicamente en el endotelio linfático, induciendo Flt4-CreERT2 entre los días E13.5 y E15.5 se observa un fenotipo similar. En general hay más vasos lacZ<sup>+</sup> en los embriones, que en su mayoría presentan aspecto de capilares sanguíneos y contienen eritrocitos. Además cuando c-Met se inactiva a E13.5 o E15.5 y los embriones se dejan desarrollar a término, alrededor de un 80% de las crías mueren o son canibalizadas por la madre durante los 12 primeros días de vida y una elevada proporción de ellas presenta ascitis quillosa en el abdomen, lo que es un fenotipo claro de anomalías en el desarrollo de los vasos linfáticos en el aparato digestivo. Efectivamente, análisis inmunohistoquímico de cortes del intestino de estas crías con anticuerpos anti-Lyve1 demuestra ausencia de vasos linfáticos en porciones del tracto digestivo que coinciden con áreas de formación de edema. Por tanto estos resultados confirman que c-Met es esencial para el desarrollo de los vasos linfáticos durante el desarrollo embrionario.

El análisis de vasos linfáticos en estas crías en órganos como el peritoneo o el diafragma mediante tinción con X-Gal revela un patrón de vasos LacZ<sup>+</sup> semejante a lo que se había observado en embriones, es decir hay un incremento de vasos teñidos con X-Gal, con morfología de capilares sanguíneos y contenido de eritrocitos, y se detecta menor tinción azul en vasos linfáticos. Por ejemplo, en la membrana del diafragma, donde en animales c-Met WT se tiñe una red vascular de vasos linfáticos, no aparecen o aparecen muchos menos vasos teñidos en los animales c-Met<sup>ΔFlt4</sup>. Esto se observa en todos los órganos analizados, aunque en diferente extensión. El análisis por inmunohistoquímica con Lyve-1 revela que no hay una disminución clara en el número de vasos linfáticos en todos los órganos, aunque es posible que exista una variabilidad de unos órganos a otros que necesitaría un estudio más detallado para ponerla de manifiesto. La menor tinción con X-Gal en algunos vasos (como en diafragma y peritoneo) así como la menor densidad de vasos linfáticos en el intestino y el fenotipo de ascitis quillosa revela que posiblemente la inactivación de c-Met durante el desarrollo embrionario resulte en un bloqueo en el desarrollo de al menos, algunos de los vasos linfáticos.

Análisis de diferentes órganos de estas crías por inmunohistoquímica con anticuerpos anti Lyve-1 o anti CD31, marcadores de endotelio linfático y sanguíneo respectivamente revela que SI/NO hay un aumento en la densidad de vasos sanguíneos y SI/NO hay un aumento/disminución de vasos linfáticos.

La inactivación de c-Met específicamente en el endotelio linfático en adultos da lugar a un fenotipo semejante al descrito en embriones, es decir mayor densidad de capilares positivos para X-Gal y elevada proporción de vasos sanguíneos positivos para X-Gal que no aparecen en los animales wt para c-Met sometidos al mismo tratamiento.

Se ha descrito que c-Met se expresa en bajos niveles en vasos linfáticos en el adulto, pero su expresión se induce fuertemente en el endotelio linfático durante procesos de inflamación y regeneración



tisular. Además in vitro el tratamiento con HGF induce proliferación, migración y formación de estructuras tubulares en células endoteliales linfáticas. In vivo, la expresión de HGF en la piel de ratones transgénicos induce la formación de vasos linfáticos (Kajiya et al. 2005). Todo esto sugiere que la señalización por HGF/c-Met puede tener una función en células endoteliales linfáticas promoviendo linfangiogénesis. Para estudiar esto en nuestro modelo, se indujo una respuesta inflamatoria con ACF después de inactivar c-Met en el endotelio linfático en adultos. En este experimento, la inactivación de c-Met conduce al desarrollo de ascitis en mayor proporción de animales y más severa que en los animales control, lo que indica que hay un defecto en la función de la vasculatura linfática. Además, como en los casos anteriores aparecen más vasos teñidos con X-Gal en este ensayo.

Es aumento en el número de vasos teñidos con X-Gal y la aparición de vasos sanguíneos teñidos es un fenotipo que se observa en todos los ensayos de inactivación de c-Met en células que expresan VEGFR3, tanto en embriones como en adulto y en este último caso tanto en condiciones fisiológicas como cuando se induce un proceso inflamatorio y linfangiogénesis. Este aumento en la densidad de vasos positivos para lacZ en el modelo, que se deben a la recombinación y escisión de la secuencia LSL mediada por Cre en el locus Rosa26 podría deberse a una expresión de VEGFR3 más generalizada en el endotelio o un aumento en sus niveles de expresión en ausencia de c-Met. Sin embargo, análisis por western blot de los niveles de VEGFR3 en embriones wt para c-Met y en embriones c-Met<sup>ΔFit4</sup> pone de manifiesto lo contrario, es decir los niveles de VEGFR3 son más bajos en extractos totales de embriones cuando se inactiva c-Met a día E13.5 o E15.5 que en los respectivos controles wt. Este resultado concuerda con la menor tinción con X-Gal de vasos linfáticos en algunos órganos en ausencia de c-Met.

## CONCLUSIONES



## Conclusiones relativas al modelo Flt4-EGFPluc

1. Se ha generado una línea de ratón modificada genéticamente que expresa la proteína de fusión EGFP-luciferasa bajo el control transcripcional endógeno del gen Flt4 (VEGFR3), mediante la construcción de un mensajero bicistrónico por inserción de un casete IRES-EGFP-luc en la región 3'UTR del gen Flt4. Esta construcción no altera los niveles de expresión fisiológicos de Flt4 y la expresión de la fusión recapitula fielmente la expresión del receptor VEGFR3.
2. La fluorescencia emitida por la EGFP en el modelo permite la visualización directa de las células que expresan VEGFR3 durante el desarrollo de los vasos linfáticos en embriones entre los días E10.5 y E13.5. La expresión de Flt4 se hace específica del endotelio linfático alrededor del día E13,5, expresándose anteriormente en el endotelio de los vasos sanguíneos.
3. La bioluminiscencia de la luciferasa en el modelo permite la detección y cuantificación de la expresión de VEGFR3 en animales adultos, en condiciones fisiológicas, mediante imagen molecular no invasiva. Durante las primeras semanas del desarrollo postnatal hay una reducción drástica en los niveles de expresión de VEGFR3 que coincide con el momento en que los vasos linfáticos se hacen independientes de la señalización de este receptor.
4. En procesos inflamatorios se induce una respuesta linfangiogénica y un incremento en los niveles de expresión del receptor VEGFR3. Este incremento puede ser monitorizado y cuantificado in vivo en el modelo por detección de luminiscencia y se correlaciona con un aumento en el número de vasos linfáticos.
5. El modelo Flt4-EGFPluc permite el seguimiento y cuantificación in vivo de la linfangiogénesis asociada al crecimiento tumoral, tanto en el área peritumoral como en los ganglios linfáticos. La inducción de luminiscencia en los ganglios linfáticos precede a la formación de metástasis y refleja un aumento en el número de vasos linfáticos en los ganglios.
6. Existe una correlación entre la inducción de luminiscencia en los ganglios linfáticos y la capacidad metastática del tumor. La inducción de linfangiogénesis en los ganglios es mediada, al menos en parte, por la expresión de VEGFC y VEGFA en el tumor.

### Conclusiones relativas al modelo Flt4-CreERT2

7. Se ha generado una línea de ratón modificada genéticamente que expresa la recombinasa inducible CreERT2 bajo el control transcripcional endógeno del gen Flt4 (VEGFR3), mediante la construcción de un mensajero bicistrónico por inserción de un casete IRES-CreERT2 en la región 3'UTR del gen Flt4. Esta construcción no altera los niveles de expresión fisiológicos de Flt4.
8. La expresión de la fusión CreERT2 recapitula fielmente la expresión del receptor VEGFR3 y la recombinasa es activa sólo cuando se induce con tamoxifeno. El nivel de inducción es alto durante el desarrollo embrionario, durante la lactancia y en animal adulto con diferentes protocolos de administración de tamoxifeno.
9. En experimentos de trazado de linajes celulares utilizando el modelo Flt4-CreERT2 y el modelo Flt4-EGFPluc se ha podido establecer por primera vez que células progenitoras endoteliales fetales que expresan VEGFR3 se transfieren a la madre gestante a través de la sangre y se reclutan a tejidos maternos en los que se induce un daño tisular (inflamación), donde contribuyen a la formación de nuevos vasos linfáticos.
10. La inactivación de c-Met específicamente en el endotelio linfático pone de manifiesto que la señalización por éste receptor en las células endoteliales linfáticas es necesaria para el desarrollo normal de los vasos linfáticos y para su mantenimiento durante el periodo adulto.

## BIBLIOGRAFÍA





- Abtahian F, Guerriero A, Sebzda E, Lu MM, Zhou R, Mocsai A, Myers EE, Huang B, Jackson DG, Ferrari VA, Tybulewicz V, Lowell CA, Lepore JJ, Koretzky GA, Kahn M.L. (2003) Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk. *Science*. 299: 247-251.
- Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Mäkinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. (1998) Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(2):548-53.
- Achen MG, Williams RA, Minekus MP, Thornton GE, Stenvers K, Rogers PA, Lederman F, Roufail S, Stacker SA. (2001) Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis. *J Pathol*. 193(2):147-54.
- Achen MG, Stacker SA. (2008) Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci*. 1131:225-34.
- Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. (1991) Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*. 114(5):1059-68
- Alitalo K, Mohla S, Ruoslahti E. (2004) Lymphangiogenesis and cancer: meeting report. *Cancer Res* 64:9225–9229.
- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. (2005) Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 15;438(7070):946-53.
- Angeli V, Ginhoux F, Llodrà J, Quemeneur L, Frenette PS, Skobe M, Jessberger R, Merad M, Randolph GJ. (2006) B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization. *Immunity*. 24(2):203-15.
- Ayadi A, Zheng H, Sobieszczuk P, Buchwalter G, Moerman P, Alitalo K, Wasylyk B. (2001) Net-targeted mutant mice develop a vascular phenotype and up-regulate egr-1. *EMBO J*. 17;20(18):5139-52.
- Bäckhed F, Crawford PA, O'Donnell D, Gordon JI. (2007) Postnatal lymphatic partitioning from the blood vasculature in the small intestine requires fasting-induced adipose factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9;104(2):606-11.
- Baldwin ME, Catimel B, Nice EC, Roufail S, Hall NE, Stenvers KL, Karkkainen MJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG. (2001) The specificity of receptor binding by vascular endothelial growth factor-d is different in mouse and man. *J Biol Chem*. 1;276(22):19166-71.
- Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, Kubo H, Stacker SA, Achen MG. (2005) Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol*. 25(6):2441-9.
- Baluk P, Tammela T, Ator E, Lyubynska N, Achen MG, Hicklin DJ, Jeltsch M, Petrova TV, Pytowski B, Stacker SA, Ylä-Herttua S, Jackson DG, Alitalo K, McDonald DM. (2005) Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation. *J Clin Invest*. 115(2):247-57.
- Baluk P, Fuxe J, Hashizume H, Romano T, Lashnits E, Butz S, Vestweber D, Corada M, Molendini C, Dejana E, McDonald DM. (2007) Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels. *J Exp Med*. 1;204(10):2349-62.
- Banks-Schlegel SP, Gazdar AF, Harris CC. (1985) Intermediate filament and cross-linked envelope expression in human lung tumor cell lines. *Cancer Res*. 45(3):1187-97
- Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, Leek RD, Moore J, van Trappen P, Cox G, Harris AL, Jackson DG. (2002) Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res*. 1;62(5):1315-20.

- Benvenuti S, Comoglio PM. (2007) The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J Cell Physiol.* 213(2):316-25.
- Billiau A, Matthys P. (2001) Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 70(6):849-60.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. (2003) Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(12):915-25.
- Butler MG, Dagenais SL, Rockson SG, Glover TW. (2007) A novel VEGFR3 mutation causes Milroy disease. *Am J Med Genet A.* 1;143A(11):1212-7.
- Cao R, Björndahl MA, Gallego MI, Chen S, Religa P, Hansen AJ, Cao Y. (2006) Hepatocyte growth factor is a lymphangiogenic factor with an indirect mechanism of action. *Blood.* 1;107(9):3531-6.
- Chen L, Hamrah P, Cursiefen C, Zhang Q, Pytowski B, Streilein JW, Dana MR. (2004) Vascular endothelial growth factor receptor-3 mediates induction of corneal alloimmunity. *Nat Med.* 10(8):813-5.
- Chen Z, Varney ML, Backora MW, Cowan K, Solheim JC, Talmadge JE, Singh RK. (2005) Down-regulation of vascular endothelial cell growth factor-C expression using small interfering RNA vectors in mammary tumors inhibits tumor lymphangiogenesis and spontaneous metastasis and enhances survival. *Cancer Res.* 1;65(19):9004-11.
- Chilov D, Kukk E, Taira S, Jeltsch M, Kaukonen J, Palotie A, Joukov V, Alitalo K. (1997) Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem.* 3;272(40):25176-83.
- Comoglio PM, Trusolino L. (2002) Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin Invest.* 109(7):857-62.
- Conrad C, Niess H, Huss R, Huber S, von Luetichau I, Nelson PJ, Ott HC, Jauch KW, Bruns CJ. (2009) Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo. *Circulation.* 20;119(2):281-9.
- Cueni LN, Detmar M. (2008) The lymphatic system in health and disease. *Lymphat Res Biol.* 6(3-4):109-22.
- Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, D'Amore PA, Dana MR, Wiegand SJ, Streilein JW. (2004) VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest.* 113(7):1040-50.
- Danilkovitch-Miagkova A, Zbar B. (2002) Dysregulation of Met receptor tyrosine kinase activity in invasive tumors *J Clin Invest.* 109(7):863-7.
- Dubernard G, Aractingi S, Oster M, Rouzier R, Mathieu MC, Uzan S, Khosrotehrani K. (2008) Breast cancer stroma frequently recruits fetal derived cells during pregnancy. *Breast Cancer Res.* 10(1):R14.
- Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K. (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science.* 30;282(5390):946-9.
- Ebata N, Nodasaka Y, Sawa Y, Yamaoka Y, Makino S, Totsuka Y, Yoshida S. (2001) Desmoplakin as a specific marker of lymphatic vessels. *Microvasc Res.* 61(1):40-8.
- Fogh J, Wright WC, Loveless JD. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* 58(2):209-14
- François M, Caprini A, Hosking B, Orsenigo F, Wilhelm D, Browne C, Paavonen K, Karnezis T, Shayan R, Downes M, Davidson T, Tutt D, Cheah KS, Stacker SA, Muscat GE, Achen MG, Dejana E, Koopman P. (2008) Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. *Nature.* 4;456(7222):643-7.

- Fritz-Six KL, Dunworth WP, Li M, Caron KM. (2008) Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *J Clin Invest.* 118(1):40-50.
- Fruman DA, Mauvais-Jarvis F, Pollard DA, Yballe CM, Brazil D, Bronson RT, Kahn CR, Cantley LC. (2000) Hypoglycaemia, liver necrosis and perinatal death in mice lacking all isoforms of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha. *Nat Genet.* 26(3):379-82.
- Gadi VK, Nelson JL. (2007) Fetal microchimerism in women with breast cancer. *Cancer Res.* 1;67(19):9035-8.
- Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH, Jackson D, Suri C, Campochiaro PA, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. (2002) Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell.* 3(3):411-23.
- Gale NW, Prevo R, Espinosa J, Ferguson DJ, Dominguez MG, Yancopoulos GD, Thurston G, Jackson DG. (2007) Normal lymphatic development and function in mice deficient for the lymphatic hyaluronan receptor LYVE-1. *Mol Cell Biol.* 27(2):595-604.
- Gordon EJ, Gale NW, Harvey NL. (2008) Expression of the hyaluronan receptor LYVE-1 is not restricted to the lymphatic vasculature; LYVE-1 is also expressed on embryonic blood vessels. *Dev Dyn.* 237(7):1901-9.
- Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M, Campuzano V, Barbacid M. (2003) Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell.* 4(2):111-20.
- Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. (1998) A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6;95(1):258-63.
- Gupta S, Ramjaun AR, Haiko P, Wang Y, Warne PH, Nicke B, Nye E, Stamp G, Alitalo K, Downward J. (2007) Binding of ras to phosphoinositide 3-kinase p110alpha is required for ras-driven tumorigenesis in mice. *Cell.* 1;129(5):957-68.
- Halin C, Detmar M. (2006) An unexpected connection: lymph node lymphangiogenesis and dendritic cell migration. *Immunity.* 24(2):129-31.
- Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A. (2007) Tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *Am J Pathol.* 170(2):774-86.
- Harvey NL, Srinivasan RS, Dillard ME, Johnson NC, Witte MH, Boyd K, Sleeman MW, Oliver G. (2005) Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat Genet.* 37(10):1072-81.
- He Y, Rajantie I, Ilmonen M, Makinen T, Karkkainen MJ, Haiko P, Salven P, Alitalo K. (2004) Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res.* 1;64(11):3737-40.
- He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, Alitalo K. (2002) Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst.* 5;94(11):819-25.
- He Y, Karpanen T, Alitalo K. (2004) Role of lymphangiogenic factors in tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 4;1654(1):3-12.
- He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S, Harding T, Jooss K, Takahashi T, Alitalo K. (2005) Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res.* 1;65(11):4739-46.

- Hirakawa S, Hong YK, Harvey N, Schacht V, Matsuda K, Libermann T, Detmar M. (2003) Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells. *Am J Pathol.* 162(2):575-86.
- Hirakawa S. (2009) From tumor lymphangiogenesis to lymphovascular niche. *Cancer Sci.* 100(6):983-9.
- Hirashima M, Sano K, Morisada T, Murakami K, Rossant J, Suda T. (2008) Lymphatic vessel assembly is impaired in *Aspp1*-deficient mouse embryos. *Dev Biol.* 1;316(1):149-59.
- Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schacht V, Hirakawa S, Detmar M, Oliver G. (2002) *Prox1* is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn.* 225(3):351-7.
- Hong YK, Shin JW, Detmar M. (2004) Development of the lymphatic vascular system: a mystery unravels. *Dev Dyn.* 231(3):462-73.
- Huang SS, Liu IH, Smith T, Shah MR, Johnson FE, Huang JS. (2006) *CRSBP-1/LYVE-1*-null mice exhibit identifiable morphological and functional alterations of lymphatic capillary vessels. *FEBS Lett.* 13;580(26):6259-68.
- Huang XZ, Wu JF, Ferrando R, Lee JH, Wang YL, Farese RV Jr, Sheppard D. (2000) Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin  $\alpha 9\beta 1$ . *Mol Cell Biol.* 20(14):5208-15.
- Huh CG, Factor VM, Sánchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. (2004) Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30;101(13):4477-82.
- Huntington GS, McClure CFW. (1908) The anatomy and development of the jugular lymph sacs in the domestic cat (*Felis domestica*). *Anat Rec* 2:1-18.
- Irjala H, Johansson EL, Grenman R, Alanen K, Salmi M, Jalkanen S. (2001) Mannose receptor is a novel ligand for L-selectin and mediates lymphocyte binding to lymphatic endothelium. *J Exp Med.* 15;194(8):1033-42.
- Ishii H, Yazawa T, Sato H, Suzuki T, Ikeda M, Hayashi Y, Takanashi Y, Kitamura H. (2004) Enhancement of pleural dissemination and lymph node metastasis of intrathoracic lung cancer cells by vascular endothelial growth factors (VEGFs). *Lung Cancer.* 45(3):325-37.
- Jaalouk DE, Ozawa MG, Sun J, Lahdenranta J, Schlingemann RO, Pasqualini R, Arap W. (2007) The original Pathologische Anatomie Leiden-Endothelium monoclonal antibody recognizes a vascular endothelial growth factor binding site within neuropilin-1. *Cancer Res.* 15;67(20):9623-9.
- Jackson DG. (2003) The lymphatics revisited: new perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med.* 13(1):1-7.
- Jackson DG. (2004) Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS.* 112(7-8):526-38.
- Jain RK. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 9(6):685-93.
- Jeffers M, Rong S, Woude GF. (1996) Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis. *J Mol Med.* 74(9):505-13.
- Jang SK, Pestova TV, Hellen CU, Witherell GW, Wimmer E. (1990) Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme.* 44(1-4):292-309.
- Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. (1997) Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science.* 30;276(5317):1423-5.

- Jeltsch M, Tammela T, Alitalo K, Wilting J. (2003) Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels. *Cell Tissue Res.* 314(1):69-84.
- Jennbacken K, Vallbo C, Wang W, Damber JE. (2005) Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *Prostate.* 1;65(2):110-6.
- Ji RC, Miura M, Qu P, Kato S. (2004) Expression of VEGFR-3 and 5'-nase in regenerating lymphatic vessels of the cutaneous wound healing. *Microsc Res Tech.* 15;64(3):279-86.
- Jiang WG, Davies G, Martin TA, Parr C, Watkins G, Mansel RE, Mason MD. (2005) The potential lymphangiogenic effects of hepatocyte growth factor/scatter factor in vitro and in vivo. *Int J Mol Med.* 16(4):723-8.
- Johnson NC, Dillard ME, Baluk P, McDonald DM, Harvey NL, Frase SL, Oliver G. (2008) Lymphatic endothelial cell identity is reversible and its maintenance requires Prox1 activity. *Genes Dev.* 1;22(23):3282-91.
- Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. (1996) A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1;15(7):1751.
- Juriscic G, Detmar M. (2009) Lymphatic endothelium in health and disease. *Cell Tissue Res.* 335(1):97-108.
- Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, Alitalo K. (1995) Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11;92(8):3566-70.
- Kajiya K, Hirakawa S, Ma B, Drinnenberg I, Detmar M. (2005) Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J.* 17;24(16):2885-95.
- Kajiya K, Kunstfeld R, Detmar M, Chung JH. (2007) Reduction of lymphatic vessels in photodamaged human skin. *J Dermatol Sci.* 47(3):241-3.
- Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA, Alitalo K, Finegold DN. (2000) Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat Genet.* 25(2):153-9.
- Karkkainen MJ, Saaristo A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K, Bueler H, Eichmann A, Kauppinen R, Kettunen MI, Ylä-Herttuala S, Finegold DN, Ferrell RE, Alitalo K. (2001) A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23;98(22):12677-82.
- Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K. (2004) Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 5(1):74-80.
- Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, Jäättelä M, Alitalo K. (2001) Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res.* 1;61(5):1786-90.
- Karpanen T, Mäkinen T. (2006) Regulation of lymphangiogenesis--from cell fate determination to vessel remodeling. *Exp Cell Res.* 10;312(5):575-83.
- Karpanen T, Wirzenius M, Mäkinen T, Veikkola T, Haisma HJ, Achen MG, Stacker SA, Pytowski B, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. (2006) Lymphangiogenic growth factor responsiveness is modulated by postnatal lymphatic vessel maturation. *Am J Pathol.* 169(2):708-18.
- Karpanen T, Alitalo K. (2008) Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol.* 3:367-97.



- Kataru RP, Jung K, Jang C, Yang H, Schwendener RA, Baik JE, Han SH, Alitalo K, Koh GY. (2009) Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. *Blood*. 28;113(22):5650-9.
- Kerjaschki D. (2005) The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis *J Clin Invest*. 115(9):2316-9.
- Kerjaschki D, Huttary N, Raab I, Regele H, Bojarski-Nagy K, Bartel G, Kröber SM, Greinix H, Rosenmaier A, Karlhofer F, Wick N, Mazal PR. (2006) Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants. *Nat Med*. 12(2):230-4.
- Kerjaschki D, Regele HM, Moosberger I, Nagy-Bojarski K, Watschinger B, Soleiman A, Birner P, Krieger S, Hovorka A, Silberhumer G, Laakkonen P, Petrova T, Langer B, Raab I. (2004) Lymphatic neoangiogenesis in human kidney transplants is associated with immunologically active lymphocytic infiltrates. *J Am Soc Nephrol*. 15(3):603-12.
- Kriederman BM, Myloyde TL, Witte MH, Dagenais SL, Witte CL, Rennels M, Bernas MJ, Lynch MT, Erickson RP, Caulder MS, Miura N, Jackson D, Brooks BP, Glover TW. (2003) FOXC2 haploinsufficient mice are a model for human autosomal dominant lymphedema-distichiasis syndrome. *Hum Mol Genet*. 15;12(10):1179-85.
- Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M, Soleiman A, Schoppmann SF, Stingl G, Kerjaschki D, Maurer D. (2001) Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med*. 17;194(6):797-808.
- Kubo H, Fujiwara T, Jussila L, Hashi H, Ogawa M, Shimizu K, Awane M, Sakai Y, Takabayashi A, Alitalo K, Yamaoka Y, Nishikawa SI. (2000) Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood*. 15;96(2):546-53.
- Kunstfeld R, Hirakawa S, Hong YK, Schacht V, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Lin C, Fiebiger E, Wei X, Wu Y, Hicklin D, Bohlen P, Detmar M. (2004) Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia. *Blood*. 15;104(4):1048-57.
- Laakkonen P, Waltari M, Holopainen T, Takahashi T, Pytowski B, Steiner P, Hicklin D, Persaud K, Tonra JR, Witte L, Alitalo K. (2007) Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res*. 15;67(2):593-9.
- Le Bras B, Barallobre MJ, Homman-Ludiye J, Ny A, Wyns S, Tammela T, Haiko P, Karkkainen MJ, Yuan L, Muriel MP, Chatzopoulou E, Bréant C, Zalc B, Carmeliet P, Alitalo K, Eichmann A, Thomas JL. (2006) VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat Neurosci*. 9(3):340-8.
- Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI. (1996) Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5;93(5):1988-92.
- Lin J, Lalani AS, Harding TC, Gonzalez M, Wu WW, Luan B, Tu GH, Koprivnikar K, VanRoey MJ, He Y, Alitalo K, Jooss K. (2005) Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor. *Cancer Res*. 1;65(15):6901-9.
- Ma H, Calderon TM, Fallon JT, Berman JW. (2002) Hepatocyte growth factor is a survival factor for endothelial cells and is expressed in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 164(1):79-87.
- Maby-El Hajjami H, Petrova TV. (2008) Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. *Histochem Cell Biol*. 130(6):1063-78.
- Maina F, Panté G, Helmbacher F, Andres R, Porthin A, Davies AM, Ponzetto C, Klein R. (2001) Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes. *Mol Cell*. 7(6):1293-306.

- Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Ylä-Herttua S, Alitalo K. (2001) Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med.* 7(2):199-205.
- Mäkinen T, Adams RH, Bailey J, Lu Q, Ziemiecki A, Alitalo K, Klein R, Wilkinson GA. (2005) PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes Dev.* 19(3):397-410.
- Mancardi S, Stanta G, Dusetti N, Bestagno M, Jussila L, Zweyer M, Lunazzi G, Dumont D, Alitalo K, Burrone OR. (1999) Lymphatic endothelial tumors induced by intraperitoneal injection of incomplete Freund's adjuvant. *Exp Cell Res.* 246(2):368-75.
- Mandriota SJ, Jussila L, Jeltsch M, Compagni A, Baetens D, Prevo R, Banerji S, Huarte J, Montesano R, Jackson DG, Orci L, Alitalo K, Christofori G, Pepper MS. (2001) Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis. *EMBO J.* 15(4):672-82.
- Mao X, Fujiwara Y, Orkin SH. (1999) Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(9):5037-42.
- Matsumoto K, Nakamura T. (2005) Mechanisms and significance of bifunctional NK4 in cancer treatment. *Biochem Biophys Res Commun.* 29(3):316-27.
- Matsumoto K, Nakamura T. (2008) NK4 gene therapy targeting HGF-Met and angiogenesis. *Front Biosci.* 13:1943-51.
- Martin P. (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 276(5309):75-81.
- Maruyama K, Ii M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M, Van Rooijen N, Takenaka H, D'Amore PA, Stein-Streilein J, Losordo DW, Streilein JW. (2005) Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *J Clin Invest.* 115(9):2363-72.
- Metzger D, Chambon P. (2001) Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods.* 24(1):71-80.
- Nagy A. (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 26(2):99-109.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. (1989) Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature.* 23(6248):440-3.
- Nguyen Huu S, Oster M, Uzan S, Chareyre F, Aractingi S, Khosrotehrani K. (2007) Maternal neoangiogenesis during pregnancy partly derives from fetal endothelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(6):1871-6.
- Ny A, Koch M, Schneider M, Neven E, Tong RT, Maity S, Fischer C, Plaisance S, Lambrechts D, Heligo C, Terclavers S, Ciesiolka M, Kalin R, Man WY, Senn I, Wyns S, Lupu F, Brandli A, Vleminckx K, Collen D, Dewerchin M, Conway EM, Moons L, Jain RK, Carmeliet P. (2005) A genetic *Xenopus laevis* tadpole model to study lymphangiogenesis. *Nat Med.* 11:998-1004.
- Ober EA, Olofsson B, Mäkinen T, Jin SW, Shoji W, Koh GY, Alitalo K, Stainier DY. (2004) *Vegfc* is required for vascular development and endoderm morphogenesis in zebrafish. *EMBO Rep.* 5(1):78-84.
- Oliver G, Detmar M. (2002) The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. *Genes Dev.* 16(7):773-83.
- Oliver G. (2004) Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol.* 4(1):35-45. Review.
- Oliver G, Srinivasan RS. (2008) Lymphatic vasculature development: current concepts. *Ann N Y Acad Sci.* 1131:75-81.

- Orlandini M, Spreafico A, Bardelli M, Rocchigiani M, Salameh A, Nucciotti S, Capperucci C, Frediani B, Oliviero S. (2006) Vascular endothelial growth factor-D activates VEGFR-3 expressed in osteoblasts inducing their differentiation. *J Biol Chem.* 30;281(26):17961-7.
- Paavonen K, Puolakkainen P, Jussila L, Jahkola T, Alitalo K. (2000) Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am J Pathol.* 156(5):1499-504.
- Paavonen K, Mandelin J, Partanen T, Jussila L, Li TF, Ristimäki A, Alitalo K, Kontinen YT. (2002) Vascular endothelial growth factors C and D and their VEGFR-2 and 3 receptors in blood and lymphatic vessels in healthy and arthritic synovium. *J Rheumatol.* 29(1):39-45.
- Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK. (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science.* 7;296(5574):1883-6.
- Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K. (1992) FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Res.* 15;52(20):5738-43.
- Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. (1999) Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer.* 1;86(11):2406-12.
- Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. (2000) VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J.* 14(13):2087-96.
- Penn PE, Jiang DZ, Fei RG, Sitnicka E, Wolf NS. (1993) Dissecting the hematopoietic microenvironment. IX. Further characterization of murine bone marrow stromal cells. *Blood.* 1;81(5):1205-13.
- Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. (2003) Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell.* 3(4):347-61.
- Pennisi D, Gardner J, Chambers D, Hosking B, Peters J, Muscat G, Abbott C, Koopman P. (2000) Mutations in Sox18 underlie cardiovascular and hair follicle defects in ragged mice. *Nat Genet.* 24(4):434-7.
- Petrova TV, Mäkinen T, Mäkelä TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, Finegold DN, Kerjaschki D, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. (2002) Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor. *EMBO J.* 2;21(17):4593-9.
- Petrova TV, Karpanen T, Norrmén C, Mellor R, Tamakoshi T, Finegold D, Ferrell R, Kerjaschki D, Mortimer P, Ylä-Herttuala S, Miura N, Alitalo K. (2004) Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med.* 10(9):974-81.
- Petrova TV, Bono P, Holnthoner W, Chesnes J, Pytowski B, Sihto H, Laakkonen P, Heikkilä P, Joensuu H, Alitalo K. (2008) VEGFR-3 expression is restricted to blood and lymphatic vessels in solid tumors. *Cancer Cell.* 13(6):554-6.
- Ponzetto C, Panté G, Prunotto C, Ieraci A, Maina F. (2000) Met signaling mutants as tools for developmental studies. *Int J Dev Biol.* 44(6):645-53.
- Purdie KJ, Whitley GS, Johnstone AP, Cartwright JE. (2002) Hepatocyte growth factor-induced endothelial cell motility is mediated by the upregulation of inducible nitric oxide synthase expression. *Cardiovasc Res.* 54(3):659-68.
- Purhonen S, Palm J, Rossi D, Kaskenpää N, Rajantie I, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Weissman IL, Salven P. (2008) Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6;105(18):6620-5.

- Pytowski B, Goldman J, Persaud K, Wu Y, Witte L, Hicklin DJ, Skobe M, Boardman KC, Swartz MA. (2005) Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody. *J Natl Cancer Inst.* 5;97(1):14-21.
- Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, Williams LT. (1993) Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;90(16):7533-7.
- Rees S, Coote J, Stables J, Goodson S, Harris S, Lee MG. (1996) Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques.* 20(1):102-4, 106, 108-10.
- Religa P, Cao R, Bjorndahl M, Zhou Z, Zhu Z, Cao Y. (2005) Presence of bone marrow-derived circulating progenitor endothelial cells in the newly formed lymphatic vessels. *Blood.* 15;106(13):4184-90.
- Ristimäki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. (1998) Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem.* 3;273(14):8413-8).
- Roberts N, Kloos B, Cassella M, Podgrabinska S, Persaud K, Wu Y, Pytowski B, Skobe M. (2006) Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res.* 1;66(5):2650-7.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM. (2000) High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet.* 25(2):139-40.
- Rooszendaal R, Mebius RE, Kraal G. (2008) The conduit system of the lymph node. *Int Immunol.* 20(12):1483-7.
- Rosen EM, Joseph A, Jin L, Rockwell S, Elias JA, Knesel J, Wines J, McClellan J, Kluger MJ, Goldberg ID, Zitnik R. (1994) Regulation of scatter factor production via a soluble inducing factor. *J Cell Biol.* 127(1):225-34.
- Sabin FR. (1902) On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am J Anat* 1:367-391.
- Sabin FR. (1904) On the development of the superficial lymphatics in the skin of the pig. *Am J Anat* 1:367-391.
- Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. (2003) VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood.* 1;101(1):168-72.
- Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, Williams M, Dvorak AM, Dvorak HF, Oliver G, Detmar M. (2003) T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J.* 15;22(14):3546-56.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C. (1995) Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature.* 23;373(6516):699-702.
- Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D (2002) Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 161:947-956.
- Sebzda E, Hibbard C, Sweeney S, Abtahian F, Bezman N, Clemens G, Maltzman JS, Cheng L, Liu F, Turner M, Tybulewicz V, Koretzky GA, Kahn ML. (2006) Syk and Slp-76 mutant mice reveal a cell-autonomous hematopoietic cell contribution to vascular development. *Dev Cell.* 11(3):349-61.

- Seo S, Fujita H, Nakano A, Kang M, Duarte A, Kume T. (2006) The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development. *Dev Biol.* 15;294(2):458-70.
- Shayan R, Achen MG, Stacker SA. (2006) Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis.* 27(9):1729-38.
- Shimoda H, Bernas MJ, Witte MH, Gale NW, Yancopoulos GD, Kato S. (2007) Abnormal recruitment of periendothelial cells to lymphatic capillaries in digestive organs of angiopoietin-2-deficient mice. *Cell Tissue Res.* 328(2):329-37.
- Silvagno F, Follenzi A, Arese M, Prat M, Giraudo E, Gaudino G, Camussi G, Comoglio PM, Bussolino F. (1995) In vivo activation of met tyrosine kinase by heterodimeric hepatocyte growth factor molecule promotes angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(11):1857-65.
- Sipos B, Kojima M, Tiemann K, Klapper W, Kruse ML, Kalthoff H, Schniewind B, Tepel J, Weich H, Kerjaschki D, Klöppel G. (2005) Lymphatic spread of ductal pancreatic adenocarcinoma is independent of lymphangiogenesis. *J Pathol.* 207(3):301-12.
- Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M. (2001) Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med.* 7(2):192-8.
- Srinivasan RS, Dillard ME, Lagutin OV, Lin FJ, Tsai S, Tsai MJ, Samokhvalov IM, Oliver G. (2007) Lineage tracing demonstrates the venous origin of the mammalian lymphatic vasculature. *Genes Dev* 21:2422-2432.
- Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG. (2001) VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med.* 7(2):186-91.
- Stacker SA, Achen MG. (1999) The vascular endothelial growth factor family: signalling for vascular development. *Growth Factors.* 17(1):1-11.
- Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. (2002) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2(8):573-83.
- Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. (2002) The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J.* 16(9):922-34.
- Soriano P. (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet.* 21(1):70-1.
- Sotillo R, García JF, Ortega S, Martin J, Dubus P, Barbacid M, Malumbres M. (2001) Invasive melanoma in Cdk4-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 6;98(23):13312-7
- Supino R, Prosperi E, Formelli F, Mariani M, Parmiani G. (1986) Characterization of a doxorubicin-resistant murine melanoma line: studies on cross-resistance and its circumvention. *Br J Cancer.* 54(1):33-42.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. (2005) The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res.* 15;65(3):550-63. Review.
- Tammela T, Saaristo A, Lohela M, Morisada T, Tornberg J, Norrmén C, Oike Y, Pajusola K, Thurston G, Suda T, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. (2005) Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood.* 15;105(12):4642-8.
- Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomäki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellström M, Schomber T, Peltonen R, Freitas C, Duarte A, Isoniemi H, Laakkonen P, Christofori G, Ylä-Herttuala S,



- Shibuya M, Pytowski B, Eichmann A, Betsholtz C, Alitalo K. (2008) Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. 31;454(7204):656-60.
- Taniguchi K, Kohno R, Ayada T, Kato R, Ichiyama K, Morisada T, Oike Y, Yonemitsu Y, Maehara Y, Yoshimura A. (2007) Spreads are essential for embryonic lymphangiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *Mol Cell Biol*. 27(12):4541-50.
- Tybulewicz VL, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC. (1991). Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* 65: 1153-1163.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V.(2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 18.
- Valtola R, Salven P, Heikkilä P, Taipale J, Joensuu H, Rehn M, Pihlajaniemi T, Weich H, deWaal R, Alitalo K. (1999) VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol*. 154(5):1381-90.
- Veikkola, T., Jussila, L., Mäkinen, T., Karpanen, T., Jeltsch, M., Petrova, T.V., Kubo, H., Thurston, G., McDonald, D.M., Achen, M.G., Stacker, S.A., and Alitalo, K. (2001). Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. *EMBO J*. 20, 1223-1231.
- Watari K, Nakao S, Fotovati A, Basaki Y, Hosoi F, Bereczky B, Higuchi R, Miyamoto T, Kuwano M, Ono M. (2008) Role of macrophages in inflammatory lymphangiogenesis: Enhanced production of vascular endothelial growth factor C and D through NF-kappaB activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 19;377(3):826-31.
- Wigle JT, Oliver G. (1999) Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*. 17;98(6):769-78.
- Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AL, Jackson DG. (2003) Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J Pathol*. 200(2):195-206.
- Wiltin J, Aref Y, Huang R, Tomarev SI, Schweigere L, Christ B, Valasek P, Papoutsi M. (2006) Dual origin of avian lymphatics. *Dev Biol* 292:165-173.
- Wissmann C, Detmar M. (2006) Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. *Clin Cancer Res*. 1;12(23):6865-8.
- Witmer AN, van Blijswijk BC, Dai J, Hofman P, Partanen TA, Vrensen GF, Schlingemann RO. (2001) VEGFR-3 in adult angiogenesis. *J Pathol*. 195(4):490-7.
- Wong SY, Haack H, Crowley D, Barry M, Bronson RT, Hynes RO. (2005) Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis. *Cancer Res*. 1;65(21):9789-98.
- Yaniv K, Isogai S, Castranova D, Dye L, Hitomi J, Weinstein BM. (2006) Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat Med* 12:711-716.
- Ylä-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. (2007) Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*. 13;49(10):1015-26.
- Young PE, Baumhueter S, Lasky LA. (1995) The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood*. 1;85(1):96-105.
- Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Bréant C, Kärkkäinen MJ, Alitalo K, Eichmann A. (2002) Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*. 129(20):4797-806.



Zarnegar R, Michalopoulos GK. (1995) The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol.* 129(5):1177-80.

Zhang N, Fang Z, Contag PR, Purchio AF, West DB. (2004) Tracking angiogenesis induced by skin wounding and contact hypersensitivity using a Vegfr2-luciferase transgenic mouse. *Blood* 103:617-26.

Zhang Q, Lu Y, Proulx ST, Guo R, Yao Z, Schwarz EM, Boyce BF, Xing L. (2007) Increased lymphangiogenesis in joints of mice with inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther.* 9(6):R118.

Zhang YW, Su Y, Volpert OV, Vande Woude GF. (2003) Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;100(22):12718-23.

## ANEXO I



## Modelos animales con fenotipo linfático

Genes	Función	Modelo	Fenotipo	Referencia
VEGFR3	Receptor de factor de crecimiento	KO	Fallo cardiovascular y alteración en las redes vasculares	Dumont et al, 1998
VEGFR3	Receptor de factor de crecimiento	Chy mice (mutación inactivante)	Linfedema, Ascitis quillosa, vasos linfáticos cutáneos hipoplásicos	Karkkainen et al, 2000
VEGF-C	Factor de crecimiento	KO	(-/-) No presentan vasculatura linfática. (+/-) retraso en el desarrollo vascular linfático, hipoplasia linfática y linfedema.	Karkkainen et al, 2004
VEGF-C	Factor de crecimiento	Transgénico (K14)	Vasos linfáticos hiperplásicos	Jeltsch et al, 1997
VEGF-D	Factor de crecimiento	Transgénico (K14)	Vasos linfáticos hiperplásicos	Veikkola et al, 2001
VEGF-A	Factor de crecimiento	Factor de crecimiento	Vasos linfáticos agrandados	Kunstfeld et al, 2004
Prox1	Factor de transcripción	KO	(-/-) No presentan vasculatura linfática, (+/-) obesidad en adultos y ascitis quillosa	Wigle et al,2002; Harvey et al, 2005
Lyve1	Receptor de hialuronanano	KO	No se observan alteraciones graves. Aumento del flujo linfático y forma atípica del lumen de los vasos.	Gale et al, 2007;Huang et al, 2006
Syk/SLP-76	Tirosina quinasa/proteína adaptadora	KO	Conexiones anormales entre sistema sanguíneo y linfático, ascitis quillosa, alteraciones en progenitores endoteliales hematopoyéticos.	Abtahian et al,2003 ;Sebzda et al, 2006.
HGF	Factor de crecimiento	Transgénico	Incremento de número y tamaño de los vasos linfáticos	Kajiya et al, 2005
Spred-1/ Spred-2	Reguladores negativos de la activación de ERK	Doble KO	Linfedema, vasos linfáticos dilatados y llenos de sangre.	Taniguchi et al, 2007
Angp14	Inhibidor de lipoproteína lipasa	KO	Alteración postnatal en la separación entre vasos linfáticos y sanguíneos en el intestino.	Backhed et al, 2007
Podoplanina	Glicoproteína de membrana	KO	Linfedema, dilatación y alteraciones en el patrón linfático. Disminución del transporte linfático.	Schacht et al,20003
Foxc2	Factor de transcripción	KO	(+/-) Hiperplasia linfática, flujo linfático retrógrado , patrón alterado y recubrimiento de pericitos en los vasos linfáticos, ausencia de válvulas y disfunción linfática (-/-).	Petrova et al, 2004; Kriederman et al, 2003
Foxc1/Foxc2	Factores de transcripción	(Foxc1 +/- ;Foxc1 -/-)	Alteración en la formación de vasos linfáticos a partir de venas embrionarias durante el desarrollo (Reducción de la expresión de VEGF-C).	Seo et al, 2006
Efrina B2	Ligando de los receptores EphB	Mutación que produce la ausencia del sitio de interacción PDZ	Establecimiento defectivo de la red linfática, hiperplasia, ausencia de válvulas, quilotorax.	Makinen et al, 2005
Neurofilina-2	Receptor de factor de crecimiento	KO	Alteración pasajera o severa de vasos linfáticos y capilares durante el desarrollo.	Yuan et al, 2002
Angiopoyetina-1	Factor de crecimiento	Transgénico (K14)	Incremento del tamaño y ramificación de los vasos linfáticos.	Tammela et al,2005
Angiopoyetina-2	Factor de crecimiento	KO	Ascitis quillosa y edema subcutáneo, patrón de vasos linfáticos y recubrimiento periendotelial anómalo de los vasos linfáticos.	Gale et al, 2002;Shimoda et al 2007

Aspp1	Proteína de unión a p53	KO	Edema subcutáneo. En el embrión la vasculatura linfática es desorganizada y no funcional, en el adulto vasos linfáticos colectores desorganizados.	Hirashima et al 2008
Adrenomedulina	Péptido vasoactivo	KO	Linfedema intersticial (KO), vasos linfáticos de la zona yugular anormales (KO condicional en células endoteliales).	Fritz-Six et al, 2008
Integrina alfa9	Receptor de adhesión	KO	Quilotorax y linfedema.	Huang et al, 2000
Net (Elk3)	Factor de transcripción	KO	Quilotorax y vasos linfáticos dilatados.	Ayadi et al, 2001
SOX18	Factor de transcripción	Mutación sin sentido	Edema, ascitis quilosa y alteraciones cardiovasculares en los folículos pilosos	Pennisi et al, 2000
pi3kca	Fosfoinositol-3 quinasa	Mutación que evita la interacción con Ras	Ascitis quilosa y reducción del número de capilares linfáticos.	Gupta et al, 2007